

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO DA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL NA RESPOSTA
DEFENSIVA DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE E RETESTE NO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.**

GRASIELLE CLOTILDES KINCHESKI

Florianópolis, SC

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO DA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL NA RESPOSTA
DEFENSIVA DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE E RETESTE NO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.**

GRASIELLE CLOTILDES KINCHESKI

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Farmacologia
do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Cata-
rina como requisito parcial à obtenção
do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis, SC

2007

**Aos meus amores: Tadeu, Marli,
Giselle, Tadeu Filho e Pablo.**

“Livros não mudam o mundo, quem muda o mundo são as pessoas. Os livros só mudam as pessoas.” Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez pelos ensinamentos e amizade que vem proporcionando não só para o meu crescimento científico, mas também para a minha formação pessoal.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia pela acessibilidade e competência em repassar seus conhecimentos.

Ao Professor Ricardo Luiz Nunez de Souza pela gentileza em avaliar e contribuir para o aprimoramento desta dissertação

Ao amigo Leandro José Bertoglio, que junto com a amiga Cláudia Anzine, acolheu-me e ensinou-me durante a entrada no laboratório e hoje como professor deste Departamento de Farmacologia contribui para o aprimoramento desta dissertação.

Aos amigos: Gladis, Cristine, Eloísa, Fabrício, Juliana, Luciane e Rimenez pelo convívio e ajuda diária que contribuiu para a formação de um grupo harmonioso e divertido.

Aos demais amigos, colegas e funcionários do Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

Minha gratidão especial aos meus familiares, meu cunhado-irmão Jeferson e ao meu companheiro Pablo pelo apoio, amizade e pelo amor incondicional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPQ), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Comportamento Defensivo	1
1.2. Substância Cinzenta Periaquedutal	4
1.3. Participação dos receptores NMDA na modulação do comportamento defensivo	8
1.4. Envolvimento do aprendizado nas respostas defensivas	10
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Animais	19
3.2. Drogas e Soluções	19
3.3. Cirurgia Estereotáxica.....	20
3.4. Cânulas.....	21
3.5. Microinjeção Intracerebral.....	22
3.6. Testes Comportamentais.....	22
3.6.1. Labirinto em cruz elevado.....	22
3.6.2. Esquiva Inibitória (Step Down).....	23
3.7. Protocolo Experimental.....	24
3.8. Análise Comportamental de ratos submetidos ao LCE.....	27
3.9. Perfusão e Histologia.....	28
3.10. Análise Estatística	29
4. RESULTADOS.....	31
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8. APÊNDICE.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE – aminoácido excitatório

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato

AP5 – ácido \pm -2-amino-5-fosfonopentanóico

Cainato - 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirolidina

%EBA – porcentagem de entradas nos braços abertos

EBF – entradas nos braços fechados

EPM – erro padrão da média

GLU - glutamato

GLY – glicina

Ifen - Ifenprodil

iGLU – receptores ionotrópicos do glutamato

IP - intraperitoneal

LCE – Labirinto em cruz elevado

mGLU – receptores metabotrópicos do glutamato

NMDA - n-metil-d-aspartato

SCD – Sistema cerebral de defesa

SCN – Sistema nervoso central

SCP – Substância cinzenta Periaquedutal

SCPd - Substância cinzenta Periaquedutal dorsal

SCPdl - Substância cinzenta Periaquedutal dorsolateral

SCPl - Substância cinzenta Periaquedutal lateral

SCPvl - Substância cinzenta Periaquedutal ventrolateral

SIC – Sistema de inibição comportamental

%TBA – porcentagem de tempo nos braços abertos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre a distância entre a presa do predador (estímulo ameaçador) e a resposta comportamental.....	3
Figura 2. Esquema ilustrado da localização e organização das subdivisões da SCP (dm: dorsomedial; dl: dorsolateral; l: lateral; vl: ventrolateral) ao longo do seu eixo rostro-Caudal.....	4
Figura 3. Protocolo experimental do LCE.....	25
Figura 4. Desenho esquemático da administração de AP5 3 nmol na SCPd imediatamente após o teste no LCE.....	25
Figura 5. Protocolo experimental do modelo da esquia inibitória.....	26
Figura 6. (A) Diagramas coronais representando o local das microinjeções na SCPd. (B) Fotomicrografia do sítio de injeção da SCPd.....	31
Figura 7. (A) Perfil comportamental minuto a minuto da %TBA do teste e reteste dos ratos microinjetados com PBS na SCPd. (B) Somatório dos cinco minutos da %EBA, EBF e avaliação de risco.....	32
Figura 8. Efeito da microinjeção de AP5 3 e 6 nmol na SCPd, em ratos, sobre a atividade nos braços abertos no teste e no reteste do LCE.....	35
Figura 9. Efeito da microinjeção de AP5 3 e 6 nmol na SCPd, em ratos expostos ao teste e reteste no LCE, sobre o número de EBF (A) e a avaliação de risco (B).....	36
Figura 10. Efeito da microinjeção de Ifenprodil 0,5 e 1 nmol na SCPd, em ratos, sobre a atividade nos braços abertos no teste e no reteste do LCE.....	38
Figura 11. Efeito da microinjeção de Ifenprodil 0,5 e 1 nmol na SCPd, em ratos expostos ao teste e reteste no LCE, sobre a avaliação de risco (A) e o número de EBF (B).....	40
Figura 12. Efeito da microinjeção de AP5 3 nmol na SCPd, imediatamente após o teste, em ratos submetidos ao teste e reteste no LCE.....	42
Figura 13. Efeito da microinjeção de AP5 na SCPd sobre a aquisição (A), consolidação (B) e evocação (C) do condicionamento aversivo no modelo da esquia inibitória.	45

Figura 14. Efeito da administração do antagonista seletivo NR-2B NMDA Ifenprodil na SCPd sobre a evocação do condicionamento aversivo no modelo da esquia inibitória.....	47
Figura 15. Curva minuto a minuto da % Tempo nos braços abertos de ratos microinjetados com AP5 3 e 6 nmol na SCPd e submetidos ao teste e reteste no LCE.....	73
Figura 16. Curva minuto a minuto da % Tempo nos braços abertos de ratos microinjetados com Ifenprodil 0,5 e 1 nmol na SCPd e submetidos ao teste e reteste no LCE.....	73

RESUMO

O labirinto em cruz elevado (LCE) tem sido amplamente utilizado como modelo nos estudos de comportamentos relacionados com ansiedade. Uma exposição ao LCE é suficiente para afetar as respostas comportamentais e farmacológicas de roedores reexpostos a este mesmo modelo (reteste). Os roedores passam a exibir um aumento da esquivas aos braços abertos e não respondem mais a drogas ansiolíticas durante o reteste. Esta mudança do estado emocional evocada pela subsequente exposição ao LCE parece envolver aspectos relacionados com diferentes tipos de ansiedade e aprendizado/memória, bem como envolver diferentes estruturas cerebrais envolvidas preferencialmente no teste e no reteste ao LCE. A substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) está envolvida nas respostas defensivas exibidas por roedores submetidos ao LCE e parece participar do processamento associativo durante o condicionamento. Com base nestes fatos, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd no comportamento defensivo de ratos expostos ao teste e reteste do LCE, assim como, a participação da SCPd na aquisição, consolidação e evocação do medo condicionado na tarefa da esquivas inibitória tipo *Step-down*. Para este propósito, ratos Wistar machos, previamente implantados com cânulas dirigidas a SCPd, foram submetidos ao teste e reteste (24 h após o teste) no LCE, 10 min após a microinjeção (0,3 µl) de PBS (Controle), AP5 (3 e 6 nmol, antagonista competitivo dos receptores NMDA) ou ifenprodil (0,5 e 1 nmol, antagonista seletivo da subunidade NR_{2B} dos receptores NMDA). Após uma semana os animais foram microinjetados com AP5 (pré/pós-teste e pré-reteste) ou com ifenprodil (pré-reteste) e testados no modelo da esquivas inibitória. Nossos resultados mostraram que o bloqueio competitivo dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd, bem como o bloqueio seletivo da subunidade NR_{2B} destes receptores, ocasionou um aumento do comportamento exploratório dos braços abertos relacionado ao comportamento ansiolítico em ratos, durante o teste e no reteste no LCE, impedindo a expressão do comportamento clássico de esquivas aprendida aos braços abertos. Entretanto, o tratamento repetido com AP5 3 nmol e Ifenprodil 1 nmol antes do teste e reteste no LCE desencadeou tolerância ao efeito ansiolítico durante o reteste. No modelo da esquivas inibitória o bloqueio competitivo ou seletivo da subunidade NR_{2B} dos receptores NMDA prejudicou a evocação da esquivas inibitória, mas não foi capaz de interferir com as etapas de aquisição ou consolidação da resposta de esquivas inibitória. Em conclusão, nossos resultados reforçam a idéia que o sistema glutamatérgico da SCPd, via modulação dos receptores NMDA, está implicado no comportamento tipo-ansiolítico em ratos. Além disso, mostram que o bloqueio dos receptores NMDA na SCPd prejudica a evocação das respostas aprendidas durante o teste tanto no LCE, quanto no modelo da esquivas inibitória, sugerindo que a SCPd é uma estrutura fundamental tanto na expressão das respostas defensivas exibidas frente a estímulos ameaçadores, quanto no processo de evocação das respostas defensivas aprendidas.

ABSTRACT

The elevated plus-maze (EPM) has been widely used as a tool to understand defensive behavior related to anxiety. Prior EPM experience alters behavioral and pharmacological responses elicited in a subsequent test exposure (retest). EPM-experienced rodents no longer respond to anxiolytics and increase open arm avoidance (OAA) in retest to EPM. This qualitative shift in the defensive responses evoked during retest has proven to be suitable to assess aspects related to learning/memory and anxiety. In addition, this shift may be related to different sets of brain structures being preferentially involved in the expression of fear/defensive behaviors during test and retest in EPM. The dorsal periaqueductal gray (dPAG) is a neural structure known to be involved in the modulation of defensive behavior in EPM. In addition, lesion studies have shown its participation in the acquisition and the expression of learned defensive responses. Based on these facts, the main aim of this study was to verify the role of glutamate acting compounds microinjected into the dPAG in the performance of rats during the test and the retest in the EPM and the participation of dPAG in acquisition, consolidation and retrieval to fear conditioning in Step-down inhibitory avoidance task (SD). For this purpose, male Wistar rats received microinjections (0.3 μ l) through the guide cannulas aiming at the dPAG: PBS (control), AP5 (3 e 6 nmol, receptor competitive NMDA antagonist) or ifenprodil (0,5 e 1 nmol, receptor subunit NR_{2B} selective NMDA antagonist), 10 min, prior to test and retest (24h after test) in the EPM. One week later, the subjects' dPAG was blocked with AP5 and Ifen prior/after-test and prior-retest in SD. The results show that the blockade of the dPAG with the competitive NMDA antagonist or the selective NR_{2B} NMDA subunit receptor antagonist increased the exploration on open arms. This effect is related to anxiolytic-like behavior in rats during the test in EPM. The microinjection of competitive or selective NR_{2B} NMDA subunit receptor antagonists in the dPAG increased the exploratory activity in open arms during the retest, preventing the expression of avoidance to open arms in a subsequent test exposure to EPM. However, repeat treatment with AP5 3 nmol and Ifenprodil 1 nmol before the test and retest in EPM induce to anxiolytic effect tolerance during the retest. The blockade of the dPAG with the competitive NR₂ or the selective NR_{2B}, NMDA subunit receptor antagonists impairs the expression of the acquired inhibitory avoidance but is not capable in interfering the acquisition or the consolidation in the SD. In conclusion, our results reinforce that glutamate system, through NMDA receptor, is involved in behavior like-anxiety. Moreover, the results demonstrate that the blockade of NMDA receptors in the dPAG impair the retrieval of learning response during the test, in both, in EPM and in inhibitory avoidance test. The present study suggest that the dPAG is a fundamental structure in the expression of defensive behavior showed toward threaten stimulus, and also is involved in the process of retrieval learning defensive response.

1. Introdução

1.1. Comportamento Defensivo

Os comportamentos defensivos são reações coordenadas e específicas do organismo frente a perigos presentes ou potenciais. Estas reações aumentam as chances de sobrevivência, garantindo assim, a preservação das espécies (ENDLER, 1986). A medida que as reações de defesa foram aperfeiçoadas pela seleção natural, sua regulação permite a situação ideal para sua expressão (NESSE, 1999). Entretanto, algumas vezes estas reações são expressas de forma excessiva ou até mesmo sem que haja uma necessidade aparente. Nestes casos, os indivíduos buscam por tratamentos que possam vir a bloquear estas reações. Usa-se codeína para cessar a tosse, antitérmicos para eliminar a febre, analgésicos para acabar com a dor e ansiolíticos para diminuir a ansiedade (NESSE, 2002).

Emoções como ansiedade, medo e tristeza também são considerados reações defensivas assim como a dor, febre e tosse (NESSE, 2001). Portanto, tem sido sugerido que os transtornos de ansiedade são causados por uma detecção falha da ameaça, ou do seu grau, produzindo uma expressão inadequada das reações de defesa (NESSE, 1999; GRAY & MCNAUGHTON, 2000). Nesta linha de raciocínio, a compreensão dos transtornos de ansiedade só será possível quando as respostas defensivas normais frente a estímulos potencialmente ameaçadores, bem como as mudanças emocionais que fazem uma resposta adaptativa tornar-se uma doença, forem compreendidas.

Dentro de uma perspectiva evolutiva, a ansiedade e o medo têm suas raízes nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência, ao bem-estar ou à integridade física das diferentes espécies (HETEM & GRAEFF, 1997).

Em roedores, sabe-se que os comportamentos defensivos são específicos para cada situação de perigo e suas variações estão intimamente relacionadas com a distância ou a intensidade do evento aversivo (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989; 1990; MCNAUGHTON & CORR, 2004). Portanto, como esquematizado na figura 1, o repertório comportamental pode variar desde um comportamento exploratório cauteloso denominado de avaliação de risco, quando o perigo é potencial, até comportamentos “finais” como imobilidade, fuga e ataque defensivo, quando há um aumento na intensidade do estímulo ameaçador. Em linhas gerais, a distância entre a presa e o estímulo ameaçador determina o padrão de resposta defensiva exibida. No entanto, o contexto no qual ocorre o confronto também é um fator determinante para o padrão do comportamento. Em situações de fuga inescapável, a presa permanece imóvel até um limite crítico de distância a partir do qual ocorre o ataque defensivo. A resposta ao mesmo estímulo é constituída por fuga quando o animal encontra-se em um contexto no qual existe esta possibilidade (MCNAUGHTON & CORR, 2004).

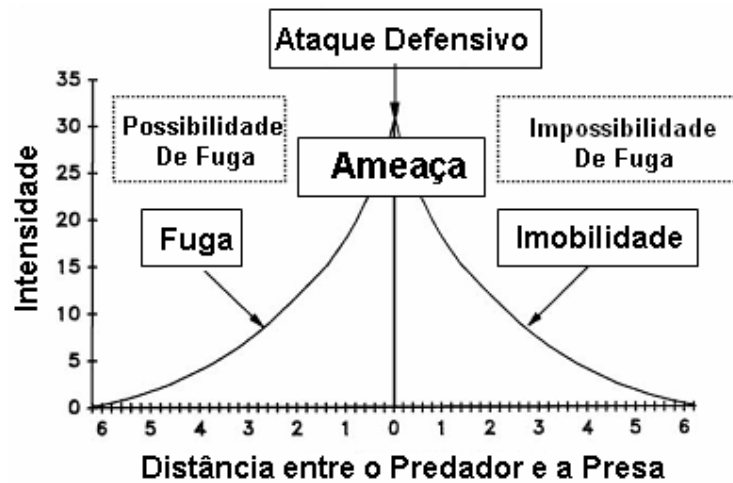


Figura 1. Relação entre a distância da presa do predador (estímulo ameaçador) e a resposta comportamental. (Adaptado de MCNAUGHTON & CORR, 2004).

As estruturas neuroanatômicas envolvidas parecem variar também com a situação de perigo, e consequentemente, com o tipo de comportamento defensivo exibido. Tem sido sugerido que quando o perigo é potencial o sistema neural responsável pelo comportamento de avaliação de risco é o sistema de inibição comportamental (SIC)¹ (GRAY, 1982). Já quando o estímulo ameaçador está muito próximo ou mesmo quando há contato direto com o predador o sistema cerebral de defesa (SCD)² seria o responsável pelos comportamentos de fuga ou agressão defensiva exibidos pelos animais (HETEM & GRAEFF, 1997). Quando os sinais de perigo estão explícitos, porém estão além de uma distância crítica, a reação típica adotada pelos animais é a de congelamento. Embora o substrato neural deste comportamento não esteja bem esclarecido, alguns estudos obtidos com lesão e estimulação elétrica ou química, sugerem que o sistema septo-hipocampal, a amígdala, o núcleo mediano da rafe e a substância cinzenta periaquedutal (SCP) possam estar envolvidos (GRAEFF, 1994).

^{1,2} Os substratos neurais pertencentes ao SIC e ao SCD estão descritos no Apêndice A.

1.2. Substância Cinzenta Periaquedutal

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) refere-se à região que circunda o aqueduto mesencefálico. A porção mais rostral da SCP localiza-se próximo à comissura posterior e a porção mais caudal próximo ao núcleo tegmental dorsal (BEHBEHANI, 1995). Devido as conexões recíprocas entre a SCP e o sistema límbico prosencefálico, a SCP foi postulada como pertencente à chamada área límbica mesencefálica (NAUTA, 1958).

Na década de 90, em uma série de trabalhos desenvolvidos no laboratório de Richard Bandler na Austrália, (CARRIVE & BANDLER, ; BANDLER *et al.*, ; 1991b; CARRIVE, 1993), foi proposta uma nova organização para a SCP, baseada na citoarquitetura funcional, utilizando-se de respostas neurovegetativas e comportamentais evocadas pela administração local de aminoácidos excitatórios (AAE). Segundo esses autores, a SCP poderia ser subdividida de forma radial em quatro regiões distintas: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral, cada uma delas formando uma coluna ao longo do seu eixo rostro-caudal (Fig. 2).

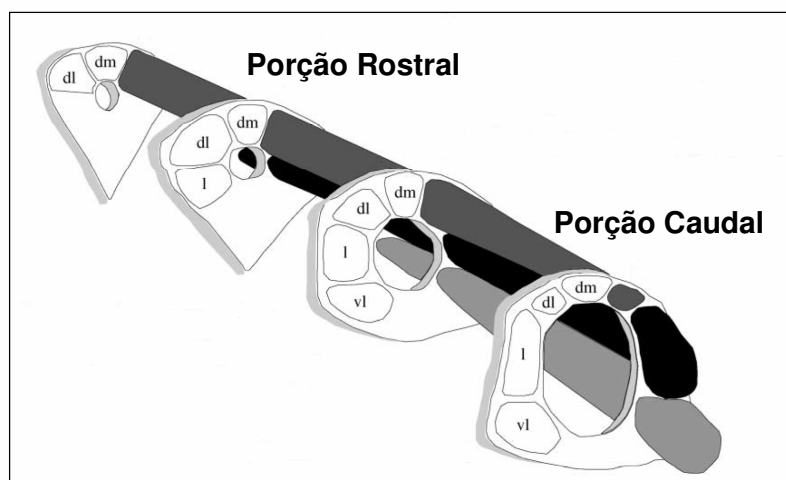


Figura 2. Esquema ilustrado da localização e organização das subdivisões da substância cinzenta periaquedutal (dm: dorsomedial; dl: dorsolateral; l: lateral; vl: ventrolateral) ao longo do seu eixo rostro-caudal. (Adaptado de BANDLER et al., 2000).

Estas regiões parecem possuir algumas características distintas entre si, principalmente no que diz respeito à imunorreatividade celular, densidade de receptores, conexões aferentes e eferentes e função (para revisão ver BANDLER *et al.*, 1991a; BLANDER & KEAY, 1996; VIANNA & BRANDÃO, 2003). As diferenças não são restritas somente às subdivisões da SCP, mas também podem ser observadas dentro de uma subdivisão ao longo do eixo rostrocaudal (BANDLER & DEPAULIS, 1991; TEIXEIRA & CAROBREZ, 1999). Desta forma, estes trabalhos demonstraram a importância de se considerar todas as dimensões (dorsoventral, mediolateral e rostrocaudal) da SCP nos estudos realizados em diferentes laboratórios.

Cameron e colaboradores (1995) compararam as projeções dos neurônios localizados na porção rostral e caudal da SCPd e observaram densas projeções do núcleo hipotalâmico anterior, núcleo ventromedial hipotalâmico e núcleo pré-mamilar dorsal para a porção rostral, enquanto que as projeções destes núcleos para a porção caudal são moderadas. As duas porções da SCPd possuem também conexões com o tálamo (RISOLD *et al.*, 1997), córtex visual secundário (NEWMAN *et al.*, 1989), córtex pré-límbico e infralímbico (AN *et al.*, 1998), núcleo dorsal da rafe (VERTES, 1991) e núcleo cuneiforme (KROUT & LOEWY, 2000). Além disso, possuem conexões intrínsecas com outras subdivisões da SCP (SANDKUHLER & HERDEGEN, 1995; JANSEN *et al.*, 1998).

Estas conexões da SCP com diferentes estruturas relacionadas ao sistema motor, sensorial, límbico e autonômico (BEITZ, 1982) é o que provavelmente possibilita a participação da SCP na mediação de funções distintas (BEITZ, 1985; VIANNA & BRANDÃO, 2003). Dados obtidos nos últimos anos têm associado a SCP à cinco funções principais: (1) regulação

autônômica; (2) lordose; (3) vocalização; (4) processamento e modulação da dor e (5) reações emocionais relacionadas com medo e ansiedade (para revisão ver: BEHBEHANI, 1995; BEITZ, 1995; CAROBREZ *et al.*, 2001).

Desde Hunsperger (1956), quando a estimulação de uma região mesencefálica, envolvendo a SCP, evocou padrões de comportamento defensivo espécie-específico, esta estrutura tem sido relacionada com as respostas defensivas (HUNSPERGER, 1956; FERNANDEZ-DE-MOLINA & HUNSPERGER, 1959, 1962; SKULTETY, 1963; EDWARDS & FLYNN, 1972). A participação da SCPd no medo/ansiedade foi posteriormente confirmada por vários experimentos que mostraram que a administração sistêmica de drogas ansiolíticas como o clordiazepóxido, diazepam ou lorazepam reduzia o caráter aversivo da estimulação elétrica da SCPd (SCHENBERG & GRAEFF, 1978; GRAEFF, 1981; 1990). Esta hipótese foi sustentada com o relato de fortes reações emocionais, descritas como sensações de medo e morte iminente, acompanhadas de alterações autonômicas: piloereção, sudorese, aumento da frequência cardíaca e ruborização da face e pescoço observadas após estimulação da SCP em humanos (NASHOLD *et al.*, 1969).

Posteriormente, estudos mostraram que lesões na SCP eliminaram ou atenuaram significativamente as reações defensivas observadas com a estimulação do hipotálamo ou da amígdala, ou ainda através do confronto com outro animal, sugerindo assim que a SCP seria uma via comum para a reação de defesa, cuja integridade parecia ser essencial para a coordenação da reatividade defensiva do animal (BANDLER, 1988; GRAEFF *et al.*, 1988). Ao longo dos anos, vários estudos comportamentais têm mostrado que a SCP é uma estrutura crítica na seleção, organização e no comando das reações defensivas comportamentais e neurovegetativas (BANDLER, 1988; GRAEFF *et*

al., 1988; BANDLER *et al.*, 1991b; FANSELOW, 1991; SUDRÉ *et al.*, 1993; BRANDÃO *et al.*, 1999; CAROBREZ *et al.*, 2001).

Além do envolvimento com as reações defensivas, diferentes subdivisões da SCP parecem estar envolvidas nas respostas de medo condicionado (LEDOUX *et al.*, 1988; KIM *et al.*, 1993; DE OCA *et al.*, 1998; VIANNA *et al.*, 2001; WALKER & CARRIVE, 2003). Lesões da substância cinzenta periaquedutal ventral (SCPv) antes ou imediatamente após o treino diminui os níveis de imobilidade durante o teste no modelo de medo contextual (KIM *et al.*, 1993; DE OCA, *et al.*, 1998). Entretanto, lesões na porção dorsal da SCP (SCPd) antes do treino não alteraram a resposta condicionada de imobilidade neste mesmo modelo (KIM *et al.*, 1993; KLASSEN *et al.*, 2002). Nos modelos de medo condicionado de lugar com um único choque (*immediate footshock*) ou com vários choques (*massed shock*) e no modelo de sobressalto acústico, onde a tarefa de medo potencializado foi realizada com choques de alta intensidade, a lesão da SCPd aumentou a resposta condicionada de imobilidade (WALKER & DAVIS, 1997; DE OCA, *et al.*, 1998; KLASSEN *et al.*, 2002). Portanto, além do conhecido envolvimento da SCP com o comportamento defensivo, esta estrutura parece também estar envolvida com a dinâmica do processamento associativo durante o condicionamento. Deste modo, a SCP pode ser mais que uma via comum e final das reações defensivas, ela deve estar interagindo com estruturas mais rostrais no cérebro, modificando o processamento das informações (VIANNA & BRANDÃO, 2003).

1.3. Participação dos receptores NMDA na modulação do comportamento defensivo

O glutamato (GLU) é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos (COLLINGRIDGE & LESTER, 1989). A liberação pré-sináptica de glutamato ativa vários receptores, que de maneira geral podem ser divididos em ionotrópicos (iGLU; ligados a um canal iônico) e metabotrópicos (mGLU; ligados a mecanismos intracelulares de transdução de sinal, via proteína G) (HOLLMANN & HEINEMANN, 1994). Os receptores ionotrópicos subdividem-se em três subgrupos: NMDA, AMPA ou cainato (BIGGE, 1999), enquanto que os receptores metabotrópicos subdividem-se em: tipos I, II ou III (CONN & PIN, 1997).

Os receptores NMDA são constituídos por cinco subunidades que agrupadas formam um poro central com condutância seletiva para Ca^{++} e Na^{+} . Estas subunidades são denominadas NR_1 (onde se liga a glicina), $\text{NR}_{2\text{A-D}}$ (onde se liga o GLU) e $\text{NR}_{3\text{A-B}}$. A presença de dois sítios independentes de glicina (NR_1) e dois sítios de glutamato (NR_2) é necessária para a construção de um receptor NMDA funcional (BENVENISTE & MAYER, 1991; CLEMENTS & WESTBROOK, 1991). Outra característica interessante é que este receptor possui diversos sítios de ligação regulatórios, tidos como alvos potenciais para ação de drogas. Além do sítio de ligação para o GLU, há um sítio de reconhecimento para o magnésio, um para o zinco, um para as poliaminas e outro sítio que reconhece concentrações submicromolares do aminoácido glicina, a qual atua como “co-agonista” deste complexo-receptor (LEESON & IVERSEN, 1994; KEMP & LEESON, 1993).

Estudos demonstraram que a diferença estrutural dos receptores NMDA altera o potencial das respostas funcionais do sistema glutamatérgico (para

revisão ver GOEBEL & POOSCH, 1999). Desta forma, o uso dos antagonistas seletivos contribui para avaliar a participação das diferentes combinações dos receptores NMDA nas diversas funções. O ifenprodil, por exemplo, é um antagonista seletivo da subunidade NR_{2B} dos receptores NMDA, a presença desta subunidade na constituição dos receptores NMDA proporcionou um aumento no potencial de ação pos-sináptico das sinápses excitatórias do glutamato, quando comparado com a combinação NR₁-NR_{2A} (MONYER *et al.*, 1994).

O sistema glutamatérgico, em especial o receptor NMDA, tem sido implicado em uma série de funções no SNC, destacando o desenvolvimento neural e a plasticidade sináptica (COTMAN & MONAGHAN, 1988), o aprendizado e a memória (MORRIS *et al.*, 1986; 1989; BLISS & COLLINGRIDGE, 1993), os danos neuronais pós-isquemia ou a hipoglicemia (MCCULLOCH, 1992), a epilepsia e outras doenças neurodegenerativas (MELDRUM, 1985; 2000), a dependência e a tolerância a drogas (ROSSETTI & CARBONI, 1995), a dor neuropática (EISENBERG *et al.*, 1998) e os transtornos emocionais, como a ansiedade e a depressão (ALTAMURA, *et al.*, 1995; MATHEW *et al.*, 2001).

No que se refere ao comportamento defensivo, a administração sistêmica de vários antagonistas do receptor NMDA têm mostrado efeito do tipo ansiolítico em diversos modelos animais da ansiedade (WENGER, 1980; BRANDÃO *et al.*, 1980; STEPHENS *et al.*, 1986; BENNETT & AMRICK, 1987; TRULLAS *et al.*, 1989; KEHNE *et al.*, 1991; BLANCHARD *et al.*, 1992; COBERT & DUNN, 1993; KOTLINSKA & LILJEQUIST, 1998; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2003).

Na SCP, estudos revelaram que os receptores NMDA estão presentes de forma expressiva na coluna dorsolateral em toda a extensão rostrocaudal (ALBIN *et al.*, 1990; BEITZ, 1995), e que a administração intra-SCPd de antagonistas NMDA também resultou em um perfil ansiolítico em diversos modelos animais de ansiedade (GUIMARÃES *et al.*, 1990; SCHMITT *et al.*, 1990; GUIMARÃES *et al.*, 1991; MATHEUS *et al.*, 1994; TEIXEIRA & CAROBREZ, 1999; CAROBREZ *et al.*, 2001; MOLCHANOV & GUIMARÃES, 2002). Por outro lado, agonistas da subunidade NR₂ (GLU, NMDA) ou NR₁ (GLY, D-serina) do receptor NMDA produziram efeito ansiogênico, quando microinjetados na SCPd (SCHMITT *et al.*, 1995; DE-SOUZA *et al.*, 1998; TEIXEIRA & CAROBREZ, 1999; CAROBREZ *et al.*, 2001; BITTENCOURT *et al.*, 2005). A microinjeção destes antagonistas na SCPd de ratos aumentam também a duração da esQUIVA inibitória no labirinto em T. Este efeito é antagonizado pela microinjeção prévia do ácido 7-cloro-quinurênico (antagonista do receptor NMDA/Glicina-B) e do AP7 (antagonista competitivo dos receptores NMDA) (SANTOS *et al.*, 2006; BERTOGLIO & ZANGROSSI, 2006).

1.4. Envolvimento do aprendizado nas respostas defensivas

Os comportamentos defensivos em roedores refletem reações espontâneas, ou seja, não condicionadas, evocadas frente a estímulos potencialmente ameaçadores. Tais estímulos ameaçadores como choque nas patas, exposição ao predador ou ao odor destes evocam comportamentos defensivos condicionados tanto ao contexto como a pistas associativas (BLANCHARD E BLANCHARD, 1969; FANSELOW, 1980). Evolutivamente, o aprendizado das respostas defensivas frente a estímulos

previamente condicionados, que remetem à ameaça (condicionamento de medo Pavloviano), é essencial para a sobrevivência das espécies e pode ser considerado um componente do sistema comportamental defensivo de mamíferos (FANSELOW, 1994). Desta maneira, estruturas responsáveis pelas reações emocionais, como a SCPd, estariam participando da dinâmica do processamento associativo durante o condicionamento, uma vez que estímulos aversivos condicionados tais como choque nas patas, exposição ao predador e odor de gato foram capazes de aumentar a expressão de proteína Fos na SCPd (CARRIVE *et al.*, 1997; CANTERAS & GOTO, 1999; DIELENBERG & MCGREGOR, 2001; DIELENBERG *et al.*, 2001; BABAI *et al.*, 2001), enquanto estímulos que induzem respostas defensivas, mas não condicionamento (MCGREGOR *et al.*, 2002; BLANCHARD *et al.*, 2003), como o odor sintético a partir das fezes da raposa (TMT- 2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina) e as fezes de gato não foram capazes de alterar a expressão do gene c-fos na SCPd (DAY *et al.*, 2004).

Apesar do envolvimento da SCPd no condicionamento não estar bem estabelecido na literatura, a participação desta estrutura nas respostas defensivas observadas em diferentes modelos de emocionalidade, como o LCE, está bem fundamentada (SCHMITT *et al.*, 1990; GUIMARÃES *et al.*, 1991; RUSSO *et al.*, 1991; MATHEUS *et al.*, 1994; SCHMITT *et al.*, 1995; DE-SOUZA *et al.*, 1998; TEXEIRA & CAROBREZ, 1999). O LCE é utilizado como modelo para estudos de comportamentos relacionados com ansiedade em camundongos e ratos de laboratório e tem sido extensivamente validado através de critérios comportamentais e farmacológicos (HANDLEY E MITHANI, 1984; PELLOW *et al.*, 1985; PELLOW & FILE, 1986; LISTER, 1987; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2002). Nos últimos anos, a análise dos índices clássicos de

ansiedade no LCE tem sido uma ferramenta útil na avaliação dos efeitos ansiolíticos de muitas drogas (HANDLEY & MITHANI, 1984; PELLOW *et al.*, 1985; GUIMARÃES *et al.*, 1991; RUSSO *et al.*, 1991; 1993; TREIT *et al.*, 1993; GUIMARÃES *et al.*, 1994; ROGERS & COLE, 1994; SCHMITT *et al.*, 1995; RODGERS *et al.*, 1995). Este aparato vem sendo usado também para o entendimento das bases neurobiológicas da emocionalidade relacionadas com aprendizado e memória, dor, mudanças hormonais, dependência e retirada de drogas (para revisão ver CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

Apesar de não representar a principal utilização do LCE, alguns estudos usam este aparato como modelo de aprendizado e memória com base na observação de que uma primeira exposição ao aparato gera uma resposta de esquia aos braços abertos aumentada em roedores. Esta esquia aprendida não sofre habituação após sucessivas exposições e pode ser prejudicada com o uso de tratamentos amnésicos como a escopolamina, MK-801, altas doses de diazepam (8 mg /Kg) e choques eletroconvulsivantes (ITOH *et al.*, 1990;1991; SHARMA & KULKARNI, 1992; MIYAZAKI *et al.*, 1995).

Durante a reexposição ao LCE (reteste) é evidente o envolvimento do aprendizado e memória no comportamento exibido por roedores, uma vez que os mesmos reduzem significativamente a exploração aos braços abertos com conseqüente aumento da esquia (ALMEIDA *et al.*, 1993; GRIEBEL *et al.*, 1993; TREIT *et al.*, 1993; RODGERS & COLE, 1994; FERNANDES & FILE, 1996; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000; 2002a; 2002b; 2002c; 2003; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2002). Este aumento da esquia aos braços abertos é observado quando comparada a primeira com a segunda exposição. Sucessivas reexposições (até 18 sessões) não foram capazes de modificar a linha de base do tempo e entradas nos braços aberto em relação à segunda

exposição. Desta forma este aumento da esquia aos braços abertos não reflete habituação após sucessivas sessões, mas uma resposta aprendida após uma exposição prévia ao labirinto (RODGERS, & COLE, 1993; RODGERS *et al.*, 1992; TREIT *et al.*, 1993).

De fato, o aumento da esquia aos braços abertos inicia em torno do segundo minuto no teste ao LCE (RODGERS *et al.*, 1996; HOLMES & RODGERS, 1998; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000), ou seja, é rapidamente aprendida, e parece ser independente da fase circadiana e das condições de iluminação (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002c) bem como das pistas na sala onde se encontra o LCE (RODGERS & DAVIS, 1997). Este aumento da esquia aos braços abertos durante o reteste não reflete um aumento dos níveis de corticosterona em ratos, quando comparado ao teste (FILE *et al.*, 1994), porém, a experiência no LCE altera o estado dos receptores benzodiazepínicos, provavelmente resultante do aumento da liberação de um agonista inverso endógeno (GONZÁLEZ & FILE, 1997).

Uma simples exposição ao LCE também é capaz de reduzir significativamente o efeito ansiolítico do clordiazepóxido em camundongo (LISTER, 1987) e ratos (FILE, 1990b; FILE *et al.* 1990). File e colaboradores (1990) descreveram este fenômeno e o chamaram de tolerância em uma sessão (*one trial tolerance*), devido a ausência de efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos em ratos testados previamente no LCE. O desenvolvimento da tolerância em uma sessão independe do intervalo entre as sessões e do material que o modelo foi construído (FILE, 1990a). Contudo, foi demonstrado que os roedores continuam respondendo às drogas ansiolíticas no reteste quando uma nova situação de conflito é introduzida na segunda exposição (PEREIRA *et al.*, 1999; ANDREATINI *et al.*, 2000) , quando o tempo da primeira

sessão é limitado a 1 minuto (DAL-COL *et al.*, 2003) ou aumentado para 10 minutos (FILE *et al.*, 1993; HOLMES & RODGERS, 1999) e quando o aprendizado é bloqueado farmacologicamente por doses altas de clorodiazepóxido (FILE *et al.*, 1990) ou pela escopolamina (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2004) antes do teste.

Recentemente, este fenômeno foi observado tanto com drogas ligantes de outras subunidades do receptor GABA (FILE, 1993; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002B), quanto com ligantes do receptor 5 HT1A da serotonina (CANTO-DE-SOUZA *et al.* 2002; NUNES DE SOUZA *et al.* 2002) e compostos antagonistas dos receptores NMDA do glutamato (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2003; 2004), assim como visualizado em outros modelos animais de ansiedade (HASCOET *et al.*, 1997; MCGREGOR & DIELENBERG, 1999; HOLMES *et al.*, 2001).

As inúmeras hipóteses sugeridas para explicar o aumento da esquia aos braços abertos e perda/diminuição do efeito ansiolítico na segunda exposição ao LCE, incluem: a) habituação locomotora (DAWSON *et al.*, 1994); b) sensibilização do medo aos braços abertos (TREIT *et al.*, 1993; RODGERS & SHEPHERD, 1993; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000); c) alteração do estado do sítio de ligação e/ou do receptor envolvido (GONZÁLES & FILE, 1997); e d) mudança no estado emocional evocado pela subsequente exposição aos braços abertos no LCE (HOLMES E RODGERS, 1998, 1999, RODGERS & SHEPHERD, 1993; DAL-COL *et al.*, 2003; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2004).

Dawson e colaboradores (1994) argumentaram que a aparente perda do efeito ansiolítico após uma prévia exposição pode ser um artefato relacionado com a habituação locomotora entre as sessões. Contudo, vários estudos

(FERNANDES & FILE, 1996; RODGERS *et al.*, 1996; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002) mostram que não há diferença nas entradas aos braços fechados, um valioso índice da atividade locomotora dos animais (CRUZ *et al.*, 1994; RODGERS & JOHNSON, 1995), e no comportamento de avaliação de risco entre as sessões.

Carobrez e Bertoglio (2005) sugerem que a mudança no estado emocional evocado pela subsequente exposição ao LCE pode envolver diferentes estruturas cerebrais preferencialmente recrutadas no teste e no reteste ao LCE. Experimentos utilizando inativação reversível com lidocaína em diferentes estruturas dão suporte a esta hipótese. Por exemplo: a inativação reversível bilateral da amígdala basolateral após o teste (FILE *et al.*, 1998) ou imediatamente antes do reteste no hipotálamo dorsomedial (FILE *et al.*, 1999), hipocampo dorsal (BERTOGLIO *et al.*, 2006) e na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (BERTOGLIO *et al.*, 2005) previne o aparecimento de tolerância aos benzodiazepínicos após uma sessão no LCE. No entanto, este fenômeno continua aparecendo com a inativação reversível do hipocampo ventral ou núcleo mediano da rafe (GONZALEZ *et al.*, 1998; BERTOGLIO *et al.*, 2006). Portanto, a resposta de esquiva aprendida aos braços abertos observada no reteste do LCE pode envolver distintas regiões relacionadas tanto com aprendizado e memória, como a amígdala e o hipocampo dorsal, quanto regiões responsáveis pela regulação das respostas defensivas, como o hipotálamo dorsomedial e SCPd.

Apesar de outras interpretações, a tolerância em uma sessão sugere que durante a exposição inicial os roedores adquirem fobia aos braços abertos, a qual, em parte, poderia explicar sua subsequente insensibilidade ao efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos (FILE *et al.*, 1993; FILE & ZANGROSSI,

1993). Isto porque o medo/ ansiedade gerados pela exposição inicial ao LCE pode ser do tipo incondicionado, enquanto que na segunda exposição o medo parece ser condicionado (FILE & ZANGROSSI, 1993; FILE *et al.*, 1993) e adquirido ao longo dos cinco minutos da primeira exposição (HOLMES & RODGERS, 1998; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002), resultando em um aumento de esquiva aos braços abertos no reteste no LCE (GRIEBEL *et al.*, 1993; TREIT *et al.*, 1993; DAWSON *et al.*, 1994; FERNANDES & FILE, 1996; GONZÁLES & FILE, 1997; HOLMES & RODGES, 1998; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002).

Apesar das sugestões e indícios do reteste no LCE exibir comportamentos condicionados à primeira exposição, para avaliar a participação da SCPd nos processos associativos do condicionamento foi utilizado no presente estudo o aparato de esquiva inibitória do tipo Step Down. Este modelo, consagrado na literatura de aprendizado e memória (IZQUIERDO *et al.*, 1992; IZQUIERDO & MEDINA, 1995; QUEVEDO *et al.*, 1997; BAST *et al.*, 2005), permiti avaliar o efeito de drogas na aquisição, consolidação e evocação do aprendizado e memória, a partir da manipulação farmacológica antes do treino, após o treino e antes do teste, respectivamente.

Dentro dos modelos de condicionamento, o teste da esquiva inibitória foi escolhido por utilizar um estímulo aversivo simples, rápido e pontual (um único choque nas patas) e uma resposta de esquiva passiva semelhante a resposta de esquiva exibida no reteste do LCE. Este modelo ativa áreas relacionadas com o condicionamento Pavloviano como hipocampo dorsal, amígdala e córtex entorrinal (IZQUIERDO *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 1992; IZQUIERDO & MEDINA, 1995; QUEVEDO *et al.*, 1997). No entanto, diferente do efeito emocional residual observado no teste do LCE, Barros e colaboradores (2000)

sugerem que a resposta defensiva de esquiva, evocada durante o reteste no aparato de esquiva inibitória, não depende dos níveis de ansiedade dos animais. Em contrapartida, Babai e colaboradores (2001) demonstraram aumento da expressão da proteína Fos em áreas relacionadas com as respostas defensivas como o hipotálamo medial e a substância cinzenta periaquedutal durante o reteste da esquiva inibitória, sugerindo a participação destas áreas na resposta evocada durante o teste neste modelo.

Fica entendido pelo exposto nesta introdução que a SCPd, uma estrutura que tem sido relacionada com as respostas defensivas, parece participar no processamento associativo durante o condicionamento. Desta maneira, o presente trabalho foi desenvolvido para verificar a participação da SCPd nas respostas de esquiva aprendida observadas durante a reexposição ao LCE e no modelo da esquiva inibitória.

2. OBJETIVOS

Com base nas evidências apontadas na introdução, o presente trabalho tem como objetivo investigar o envolvimento da SCPd nas respostas aprendidas de esquiva exibida durante a reexposição ao LCE e no teste da esquiva inibitória. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

1) Avaliar o papel dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd no comportamento de ratos submetidos ao teste e reteste no LCE, através de microinjeções nesta estrutura de seus antagonistas competitivo e seletivo da subunidade NR_{2B}, AP5 e Ifenprodil, respectivamente.

2) Analisar o envolvimento dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd nas etapas de aquisição, consolidação e evocação da esquiva no teste da esquiva inibitória.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações Éticas

O presente trabalho envolveu procedimentos experimentais que estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências, e que foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (278/CEUA e 23080.006118/2004-36/UFSC). Em adição, procuramos utilizar um tamanho de amostra mínimo, mas adequado para as análises estatísticas, e extrair o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos.

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 3–4 meses de idade, pesando entre 300 e 400 g. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (15 x 36 x 30 cm), em duplas ou trios. Durante todo o período de permanência no biotério, os animais tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em ambiente com temperatura (23 ± 1 °C) e ciclo de luz (12 h claro/escuro) controlados, iniciando o claro às 7 h.

3.2. Drogas e Soluções

Nos experimentos realizados as seguintes drogas foram utilizadas: xilazina (10 mg/ml; Rompun®, Bayer, Brasil), quetamina (58 mg/ml; Dopalen®, Agribbrands, Brasil), Xilocaína 2%(2-dietil-N—[2,6-dietifenil]-acetamida HCl, RBI, EUA)), AP5 (ácido \pm -2-amino-5-fosfonopentanóico,RBI, EUA) 3,0 e 6,0 nmol, Ifenprodil (Tocris, UK) 0,5 e 1 nmol, Giemsa (Sigma-Aldrich), DPX (Fluka), CitriSolv™ (Fisher brand) e Azul de Evans (Sigma, EUA). PBS

(tampão fosfato-salina) foi utilizado como veículo para dissolver as drogas e como controle.

3.3. Cirurgia Estereotáxica

Cada animal foi anestesiado com uma injeção IP (intraperitoneal) de 1,5 ml/kg de uma solução combinada (1:1) de xilazina e quetamina. Uma vez verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se a tricotomia de toda a parte superior da cabeça do animal.

Após a adaptação do animal ao aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, EUA), realizou-se a assepsia da área desejada com álcool iodado. Injetou-se então uma solução de xilocaína com adrenalina (2 %), por via subcutânea, com objetivo de obter efeito anestésico local e vasoconstritor, e através da formação de uma pápula, orientar a retirada de uma pequena área ovalada da pele. Em seguida, realizou-se a raspagem do periósteo, deixando a calota craniana exposta permitindo a visualização das suturas lambdóide e da coronária.

O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem situados em um mesmo plano horizontal. Após a hemostasia, a calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula-guia de 13 mm. Os dois parafusos foram colocados logo atrás da sutura coronária.

Para o implante da cânula as medidas foram aferidas e a elas adicionadas as coordenadas obtidas do Atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998) referentes às porções caudal da SCPd (anteroposterior (AP)= - 7,6 mm, em relação ao Bregma, médio-lateral (ML) = +1,9 mm e dorso-ventral (DV) = -2 mm a partir da superfície externa do osso craniano) em um ângulo de

22 °. Na cânula foi adaptado um mandril nº 30, com o intuito de prevenir o seu entupimento.

Após adaptar os parafusos, a cânula e o mandril, o osso foi seco e a área aberta foi preenchida com uma camada de acrílico auto-polimerizável que, ao endurecer, incorporou todas as peças em uma prótese sólida. Decorridos alguns minutos para a secagem total da prótese, o animal pôde ser retirado do aparelho estereotáxico.

Após a cirurgia os animais foram mantidos em uma sala com o aquecedor ligado a uma temperatura de 25° a 27°C para evitar a hipotermia conseqüente da anestesia geral. Posteriormente, os animais retornaram ao biotério nas gaiolas moradias, com livre acesso à água e comida, onde permaneceram por no mínimo 5 dias, até o início dos testes experimentais.

3.4. Cânulas

As cânulas-guia implantadas a fim de possibilitar as microinjeções na SCPd foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm. As agulhas foram cortadas e com o auxílio do paquímetro (Mitutoyo – Brasil), as cânulas foram ajustadas para 13 mm. Cada cânula possuía um anteparo (próprio da agulha utilizada), o qual impediu a sua total introdução pelo orifício feito previamente com a broca odontológica.

3.5. Microinjeção Intracerebral

Para realizar a microinjeção na SCPd foi utilizada uma agulha de 16,2 mm confeccionada a partir de agulhas odontológicas, conectada por um tubo de polietileno a microseringa Hamilton (5 µl). A seringa foi preenchida com água destilada e as soluções a serem injetadas, separadas por uma bolha de ar.

Para a microinjeção, o animal foi imobilizado manualmente e foi retirado o mandril adaptado à cânula-guia durante o ato cirúrgico. A cânula foi limpa com uma lima odontológica, com 12 mm de comprimento. Posteriormente, a agulha foi introduzida pela cânula e com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight, modelo BI 2000) cada animal recebeu com um volume de 0,3 µl de solução, através de uma taxa de infusão de 0,60 µl / min, em 30 s.

3.6. Testes Comportamentais

3.6.1. Labirinto em cruz elevado

O equipamento utilizado consiste de quatro braços de madeira dispostos em formato de cruz grega, esses braços encontram-se alinhados, dois braços fechados por paredes (50 x 10 x 40 cm) opostos a dois braços abertos (50 x 10 cm), sendo que tais braços abertos são circundados por um anteparo de acrílico (1 cm de altura) para evitar a queda dos animais.

O aparato estava localizado em uma sala com iluminação fluorescente, cuja intensidade foi fixada em 44 lux.

Os animais foram submetidos ao teste por 5 min e após 24 horas, reexpostos ao aparelho também por 5 min (reteste). As duas exposições ao LCE foram gravadas em fitas cassetes para posterior leitura do comportamento

minuto-a-minuto. Após o teste de cada animal, o LCE foi limpo com solução de etanol 10%. Após a microinjeção, o animal foi colocado em outra gaiola onde permanecia por mais 10 min sendo então submetido ao modelo. O animal foi transferido para a sala do teste e colocado diretamente na plataforma central do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Vinte e quatro horas após, todos os grupos foram novamente submetidos ao LCE (reteste) por 5 min, após nova administração de drogas.

Os grupos experimentais e o controle foram realizados em paralelo; todos os experimentos foram realizados entre 13 e 17 h e as doses, assim como os tempos de tratamento, foram selecionados de acordo com dados da literatura (DE-SOUZA *et al.*, 1998; PANDÓSSIO & BRANDÃO, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2001; TEIXEIRA, 2002). Para evitar o fenômeno de dependência de estado nos resultados do reteste do LCE, tanto o grupo controle quanto o grupo que recebeu tratamento farmacológico no teste do LCE, foram divididos e tratados com droga e controle, no reteste. Sendo assim, no final desta etapa temos para cada droga 4 grupos, conforme ilustrado na figura 3.

3.6.2. Esquiva Inibitória (*Step Down*)

O aparato da esquiva inibitória consiste de uma caixa de acrílico (50 x 25 x 25 cm²) que possui uma grade formada de barras de aço inoxidável (1 mm de diâmetro separadas 1 cm uma da outra) no assoalho. Esta grade é acoplada a uma fonte geradora de choque. Na parede lateral à direita da caixa há uma plataforma de 7 cm de largura e 2,5 cm de altura.

Na sessão de teste, os animais foram colocados na plataforma e imediatamente após descenderem com as quatro patas sobre o piso gradeado

receberam um choque de 0,4 mA por 2 s. Na sessão de reteste, 24 horas após o teste, os animais retornaram à plataforma e o tempo de latência para descida da mesma foi cronometrado. Durante o reteste a latência máxima de descida da plataforma foi 180 segundos.

Sete dias após o reteste no LCE, os animais foram submetidos a este modelo. Os ratos foram tratados 10 minutos antes do teste, ou do reteste, ou imediatamente após o teste, dependendo do protocolo experimental (Fig. 5). O tempo de descida da plataforma na sessão de reteste serviu como índice direto de retenção de memória.

3.7. Protocolo Experimental

3.7.1. Participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd nos comportamentos observados durante o teste e reteste do LCE.

No experimento, 1 foi microinjetado AP5, um antagonista competitivo dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, na SCPd, para avaliar a participação do sistema glutamatérgico/NMDA da SCPd no teste e reteste do LCE. As microinjeções de PBS (controle) e AP5 nas doses de 3 ou 6 nmol (tratamento farmacológico) foram realizadas segundo o protocolo experimental demonstrado na figura 3. Estas doses de AP5 foram selecionadas de experimentos prévios em nosso laboratório (ANZINI, 2005).

No experimento 2, foi utilizado um antagonista dos receptores de glutamato do tipo NMDA, seletivo para a subunidade NR-2B, para observar a participação deste subtipo de receptor da SCPd no teste e reteste do LCE. Semelhante ao protocolo anterior, foram microinjetadas duas doses de

Ifenprodil (Ifen) 0,5 e 1 nmol (tratamento farmacológico) antes do teste e antes do reteste no LCE e PBS (Controle), seguindo o protocolo experimental esquematizado na figura 3.

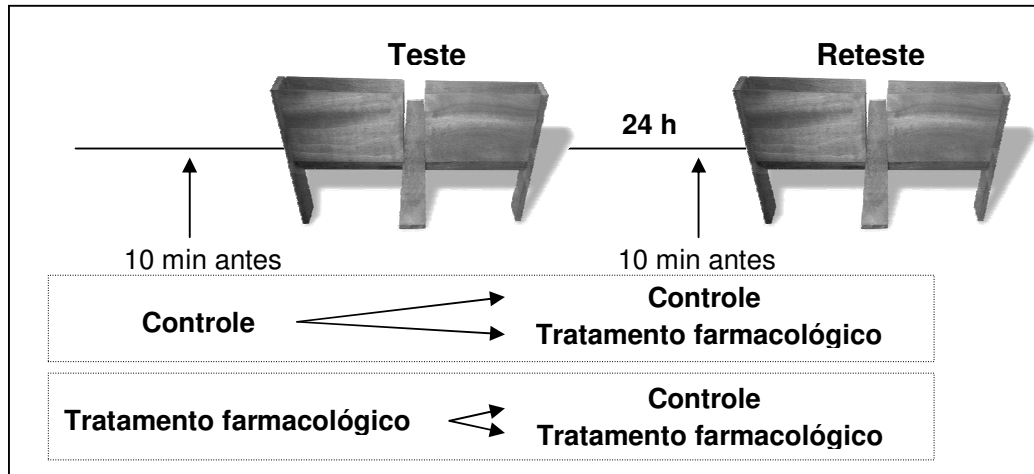


Figura 3: Protocolo experimental do labirinto em cruz elevado.

No experimento 3, a dose de 3 nmol de AP5 foi selecionada para verificar a participação da SCPd no processo de consolidação do comportamento adquirido durante o teste e exibido no reteste do LCE. A microinjeção de AP5 3 nmol na SCPd foi realizada imediatamente após o teste no LCE, segundo protocolo experimental esquematizado na figura 4.

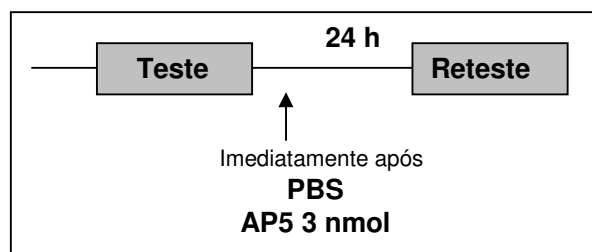


Figura 4: Desenho esquemático da administração de AP5 3 nmol na SCPd imediatamente após o teste no LCE.

3.7.2. Participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd na aquisição, consolidação e expressão do medo aprendido na tarefa de esQUIVA inibitória.

No experimento 4, AP5 (tratamento farmacológico) na dose de 6 nmol e PBS (controle) foram administrados antes ou imediatamente após o teste ou antes do reteste para verificar o efeito do bloqueio dos receptores NMDA da SCPd respectivamente na aquisição, consolidação e na expressão do medo aprendido no modelo da esQUIVA inibitória, segundo o protocolo experimental demonstrado na figura 5. Como a dose de AP5 6 nmol antes do reteste prejudicou somente o processo de evocação da tarefa de esQUIVA inibitória, a dose de AP5 3 nmol, bem como a microinjeção de Infenprodil (antagonista seletivo da subunidade NR_{2B}) 0,5 e 1 nmol (tratamento farmacológico) foram realizadas somente antes do reteste da esQUIVA inibitória.

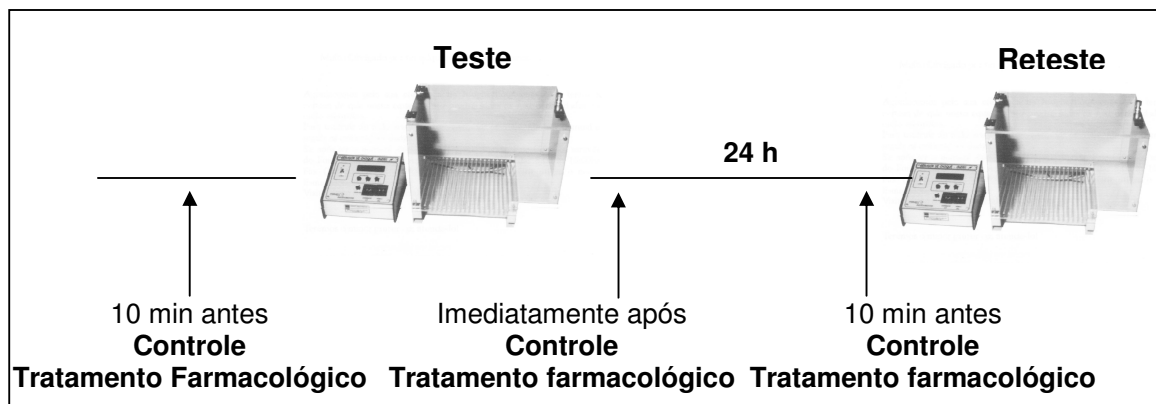


Figura 5: Protocolo experimental do modelo da esQUIVA inibitória.

3.8. Análise Comportamental de ratos submetidos ao LCE

Os parâmetros comportamentais registrados minuto a minuto e posteriormente agrupados em blocos de 5 minutos durante o teste e/ou reteste foram:

- Frequência de entradas dos animais nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto;

- Tempo de permanência dos animais nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto;

- Frequência de tentativas de entradas nos braços abertos, sendo considerado tentativa, o ato do animal colocar até 3 patas em um dos braços abertos, seguida de retração à posição original. Este parâmetro parece estar relacionado ao comportamento de avaliação de risco (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000).

Posteriormente, foram calculados os índices clássicos de ansiedade: a porcentagem de número de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas nos quatro braços (%EBA) e a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), durante os 5 minutos de exposição ao LCE.

Para uma análise mais detalhada da porcentagem de tempo nos braços abertos, dividiu-se este parâmetro em sessões de 1 minuto. O registro minuto a minuto permite avaliar a distribuição do comportamento dos animais ao longo da sessão (RODGERS *et al.*, 1996; HOLMES & RODGERS, 1998, CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

3.9. Perfusão e Histologia

Após o teste comportamental, os animais foram anestesiados com a combinação anestésica descrita no item 3.3., por via IP e perfundidos, via intracardíaca, com solução salina (NaCl 0,9 %), seguida por uma solução de formaldeído (10 %).

Posteriormente, os animais foram decapitados e receberam uma microinjeção de Azul de Evans (0,30 µl) para determinar o sítio da microinjeção. Seguiu-se a remoção dos encéfalos que foram acondicionados em solução formaldeído (10 %), e solução de sacarose (30%), por no mínimo 1 dia em cada solução. Cortes coronais (50 µm) foram feitos em um criostato (Leica, modelo CM 1850, Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha) e montados sobre lâminas de vidro para microscopia, previamente gelatinizadas, e imediatamente observadas em microscópio óptico para identificação do local marcado com azul de Evans. Os sítios das injeções foram identificados através da comparação do corte com o diagrama do Atlas de Paxinos e Watson (1998). Foram incluídos na análise estatística os animais com histologia positiva, ou seja, com microinjeção na SCPd.

Para confecção das fotomicrografias, as lâminas, previamente montadas, permaneciam secando durante uma semana, para então serem coradas. Primeiro as lâminas eram lavadas e hidratadas duas vezes, durante 2 min, em uma cuba contendo água destilada. Posteriormente, foram imersas em corante de Giemsa (Sigma-Aldrich) por 6 min e lavadas com água destilada. Em seguida, as lâminas foram passadas nos álcoois 70%, 90%, 100%, 100%, 2 min em cada, e em seguida foram colocadas em CitroSolv, duas vezes de 5 min cada. Por fim, as lâminas foram cobertas com lamínulas e seladas com DPX (resina sintética). Em seguida, as lâminas coradas foram fotografadas em

um microscópio óptico acoplado a um sistema de captura de imagem (Olympus Co. modelo BX41, Melville, NY, EUA). Os cortes foram comparados com os diagramas obtidos do Atlas (PAXINOS & WATSON, 1998).

3.10. Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico (Statistica®- StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) e representados em gráficos do programa Prisma 4.

Os dados do teste e reteste (sessões de 5 minutos), expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), foram inicialmente submetidos ao teste uni-variado de Bartlett, para a verificação de homogeneidade das variâncias.

Os parâmetros estudados no teste do LCE foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de teste *post hoc* de Fisher. Para tanto, foi considerado como variável independente os tratamentos intra-SCPd, como variáveis dependentes os parâmetros comportamentais observados e a histologia positiva como condição.

No reteste do LCE, os parâmetros estudados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via com repetição seguido de teste *post hoc* de Fisher. Foi considerado como variável independente os tratamentos no teste e no reteste intra-SCPd, como variáveis dependentes os parâmetros comportamentais observados e a histologia positiva como condição.

O perfil minuto a minuto dos grupos controles foi analisado através da ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Fisher. Neste caso, o tempo foi considerado como variável independente e a % tempo nos braços abertos como variável dependente. A Comparação entre o teste e reteste no LCE dos

parâmetros de %EBA, EBF e avaliação de risco, deste grupo, foi analisada através do teste “t” de Student.

No modelo da esquiva inibitória foi estabelecido um tempo máximo de permanência no aparato de 180 segundos durante a sessão de reteste. Por essa razão, os resultados neste modelo foram expressos como dados não paramétricos, representados por mediana \pm intervalos interquartil. O efeito do tratamento foi analisado através do teste não paramétrico de Kruskal Wallis. A análise estatística para 2 grupos individualmente foi realizada através do teste U de Mann Whitney. A diferença dos dados entre o treino e teste foi analisada através do teste de Wilcoxon.

Em todos os testes estatísticos acima citados, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Histologia

Nosso laboratório tem trabalhado com a porção dorsal da SCP (SCPd), que compreende as colunas dorso-medial e dorso-lateral descritas por Bandler e colaboradores (CAROBREZ *et al.*, 1983; GUIMARÃES *et al.*, 1990; SCHIMITT *et al.*, 1990; MATHEUS *et al.*, 1994; SCHIMITT *et al.*, 1995; DE-SOUZA *et al.*, 1998; TEXEIRA & CAROBREZ, 1999; CAROBREZ *et al.*, 2001; BERTOGLIO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006). Neste trabalho, as microinjeções foram realizadas na porção caudal das colunas dorso-medial e dorso-lateral, representadas na figura 6.

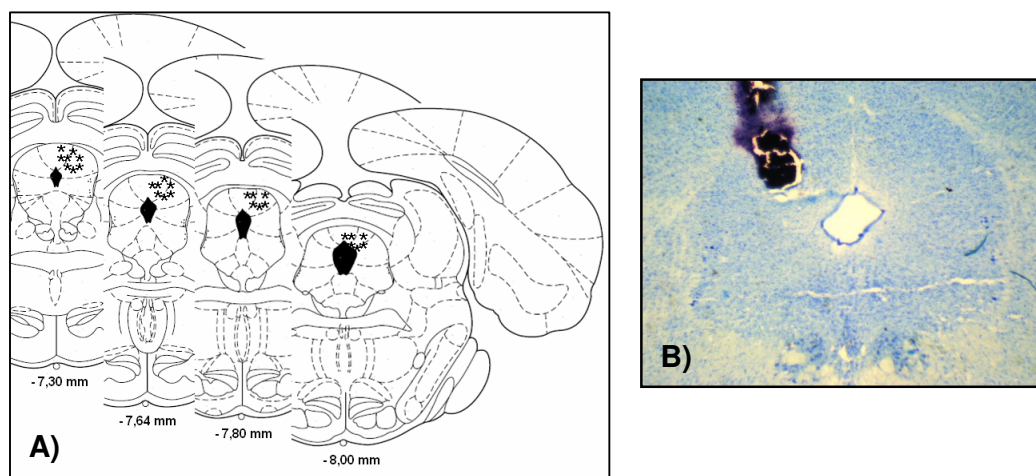


Figura 6: (A) Diagramas coronais representando o local das microinjeções na SCPd. Devido à superposição de injeções o número aqui representado é menor que o observado experimentalmente. Os valores em mm representam as distâncias em relação ao Bregma. (diagramas adaptados de PAXINOS & WATSON, 1998). (B) Fotomicrografia do sítio de injeção da SCPd.

4.2. Perfil comportamental dos ratos controles expostos ao teste e reteste no LCE.

A figura 7 ilustra o perfil comportamental minuto a minuto da %TBA dos animais microinjetados com PBS (animais controles) no teste e reteste no LCE. O número da amostra foi constituído de vinte e dois ratos (soma dos nove controles do experimento 1, seis controles do experimento 2 e sete controles do experimento 3).

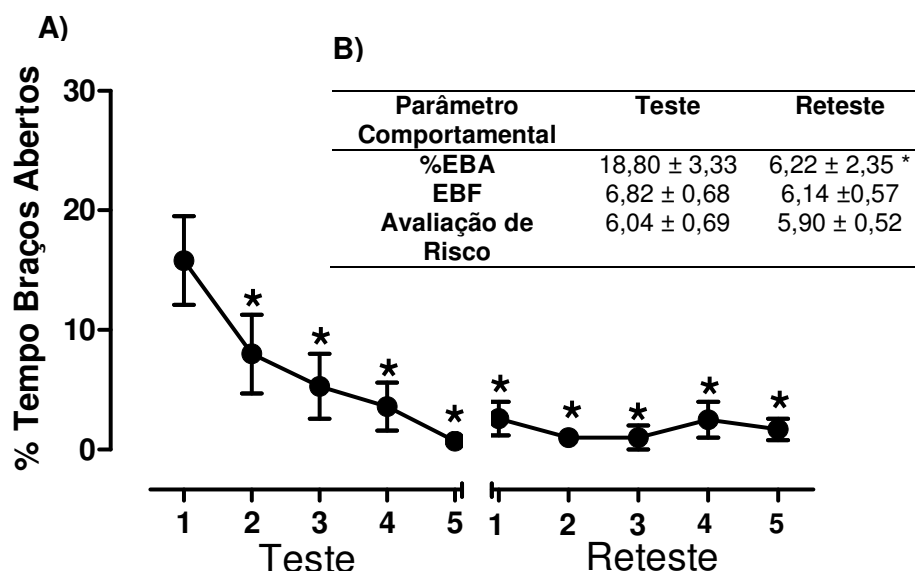


Figura 7. (A) Perfil comportamental minuto a minuto da %TBA do teste e reteste dos ratos microinjetados com PBS na SCPd. * $p < 0,05$ comparado ao primeiro minuto do teste, teste de Fisher. (B) Somatório dos cinco minutos da %EBA, EBF e avaliação de risco, * $p < 0,05$ comparado teste do LCE, teste “t” de Student. Os dados estão representados como média \pm EPM ($n = 22$).

A ANOVA revelou diferenças no perfil minuto a minuto na %TBA [$F(9,210) = 5,093$; $p = 0,001$] nos animais que receberam PBS (solução controle) na SCPd. O teste de Fisher demonstrou que a %TBA diminuiu depois do primeiro minuto no teste e permanece reduzida durante o reteste no LCE.

Para os animais microinjetados com PBS na SCPd o teste “t” de Student mostrou diferença significativa ($t = 4,44$; $p = 0,002$) na %EBA, entre o teste e o

reteste no LCE. A EBF ($t= 1,014$; $p= 0,922$) e o parâmetro de avaliação de risco ($t= 0,19$; $p= 0,848$) não variaram ao longo do teste e reteste nestes animais, sugerindo não haver prejuízo locomotor ou habituação durante as duas exposições ao LCE.

4.3. Efeitos do bloqueio dos receptores NMDA da SCPd em ratos submetidos ao teste e reteste no LCE

4.3.1. Experimento 1:

As Figuras 8 e 9 ilustram o efeito da microinjeção de AP5 3 ou 6 nmol na SCPd sobre o comportamento observado em ratos submetidos ao teste e ao reteste no LCE.

O número de ratos utilizados no experimento 1 foi: PBS/PBS, 9; PBS/AP5 3 nmol, 7; PBS/AP5 6 nmol, 12; AP5 3 nmol/PBS, 11; AP5 3 nmol/AP5 3nmol, 7; AP5 6 nmol/ PBS, 9 e AP5 6 nmol/AP5 6 nmol, 11.

A ANOVA revelou efeito do tratamento com AP5 na % TBA [$F(2,62)= 35,869$; $p=0,001$] e %EBA [$F(2,62)= 23,955$; $p=0,001$] durante o teste no LCE. A Análise *post-hoc* mostrou que os grupos que receberam microinjeções de AP5 3 e 6 nmol na SCPd aumentaram a %TBA e a %EBA em relação ao grupo controle. Portanto, estes resultados demonstram que o bloqueio competitivo dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd pelo AP5 produz aumento do comportamento exploratório dos ratos aos braços abertos durante o teste no LCE, sugerindo, assim, que o antagonismo dos receptores ionotrópicos do tipo NMDA da SCPd tem efeito tipo-ansiolítico nos ratos expostos ao LCE (Fig. 8).

Durante o reteste, a ANOVA mostrou efeito significativo na %TBA para o fator tratamento [$F(6,58) = 9,886$; $p= 0,001$], para o fator repetição [$F(1,58) =$

15,067; $p= 0,003$] e para a interação entre estes dois fatores [$F(6,58) = 11,709$; $p= 0,001$]. Da mesma maneira, a ANOVA também mostrou efeito significativo na %EBA para o fator tratamento [$F(6,58) = 10,532$; $p= 0,001$], para o fator repetição [$F(1,58) = 6,067$; $p= 0,017$] e para a interação entre estes dois fatores [$F(6,58) = 10,432$; $p= 0,001$], durante o reteste do LCE.

Para os animais que receberam PBS na SCPd antes do teste e AP5 nas doses de 3 ou 6 nmol antes do reteste, a análise *post-hoc* revelou um aumento significativo na %TBA e na %EBA durante o reteste quando comparado ao seu controle experimental (o grupo que recebeu PBS antes do teste e do reteste) e quando comparado ao seu próprio desempenho no dia do teste no LCE. A análise *post-hoc* revelou ainda uma redução na %EBA durante o reteste do grupo microinjetado com PBS antes do teste e do reteste quando comparado ao seu próprio desempenho no dia do teste.

Para os animais microinjetados na SCPd com AP5 3 nmol antes do teste e PBS ou AP5 3 nmol antes do reteste, a análise *post-hoc* revelou uma redução significativa na %TBA e na %EBA durante o reteste quando comparado ao seu próprio desempenho no dia do teste do LCE. Esses dois grupos não apresentaram diferenças significantes entre si nos parâmetros analisados acima no reteste.

Para os animais microinjetados na SCPd com AP5 6 nmol antes do teste e PBS do reteste, a análise *post-hoc* revelou uma redução significativa na %TBA e na %EBA durante o reteste quando comparado ao seu próprio desempenho no dia do teste do LCE. A análise *post-hoc* mostrou ainda que o grupo microinjetado com AP5 6 nmol antes do teste e do reteste apresentou um aumento significativo na %TBA e na %EBA durante o reteste quando comparado ao grupo que recebeu AP5 6 nmol antes do teste e PBS antes do

reteste (considerado seu grupo controle durante o reteste) e uma tendência ($p=0,089$) na redução da %TBA durante o reteste quando comparado ao seu próprio desempenho no dia do teste.

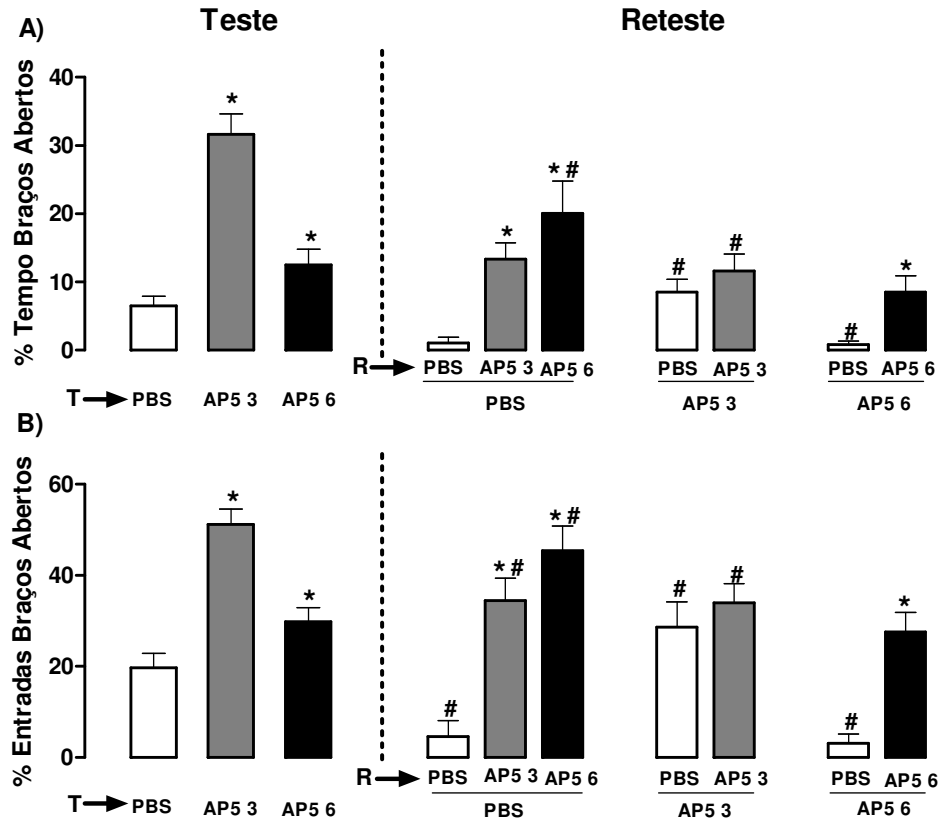


Figura 8. Efeito da microinjeção de AP5 3 e 6 nmol na SCPd, em ratos, sobre a atividade nos braços abertos no teste e no reteste do LCE. Os dados estão representados como média \pm EPM ($n=7-12$). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo no teste. R \rightarrow Tratamento antes do reteste. T \rightarrow Tratamento antes do teste.

A ANOVA não demonstrou efeito significativo para o fator tratamento nem nas EBF [$F(2,62) = 0,302$; $p = 0,740$], nem para o parâmetro de avaliação de risco [$F(2,62) = 1,671$; $p = 0,196$] durante o teste. Assim como não revelou efeito significativo nas EBF para o fator tratamento [$F(6,58) = 1,982$; $p = 0,083$], fator repetição [$F(1,58) = 0,980$; $p = 0,326$] e interação entre estes fatores [$F(6,58) = 1,562$; $p = 0,175$] durante o reteste, sugerindo ausência de efeito sobre a atividade exploratória geral (Figura 9 B).

No parâmetro de avaliação de risco, a ANOVA revelou um efeito significativo para o fator tratamento [$F(6,58) = 2,793$; $p = 0,019$], porém não significativo para o fator repetição [$F(1,58) = 0,085$; $p = 0,771$] e uma tendência para a interação entre o fator tratamento e fator repetição [$F(6,58) = 2,070$; $p = 0,071$], durante o reteste (Fig. 9 A). A análise *post-hoc* mostrou uma redução significativa na avaliação de risco durante o reteste, do grupo que recebeu AP5 6 nmol antes do teste e reteste quando comparado com o seu controle experimental (o grupo que recebeu AP5 6 nmol antes do teste e PBS antes do reteste), e uma tendência na redução deste valor no reteste quando comparado ao seu desempenho no dia do teste.

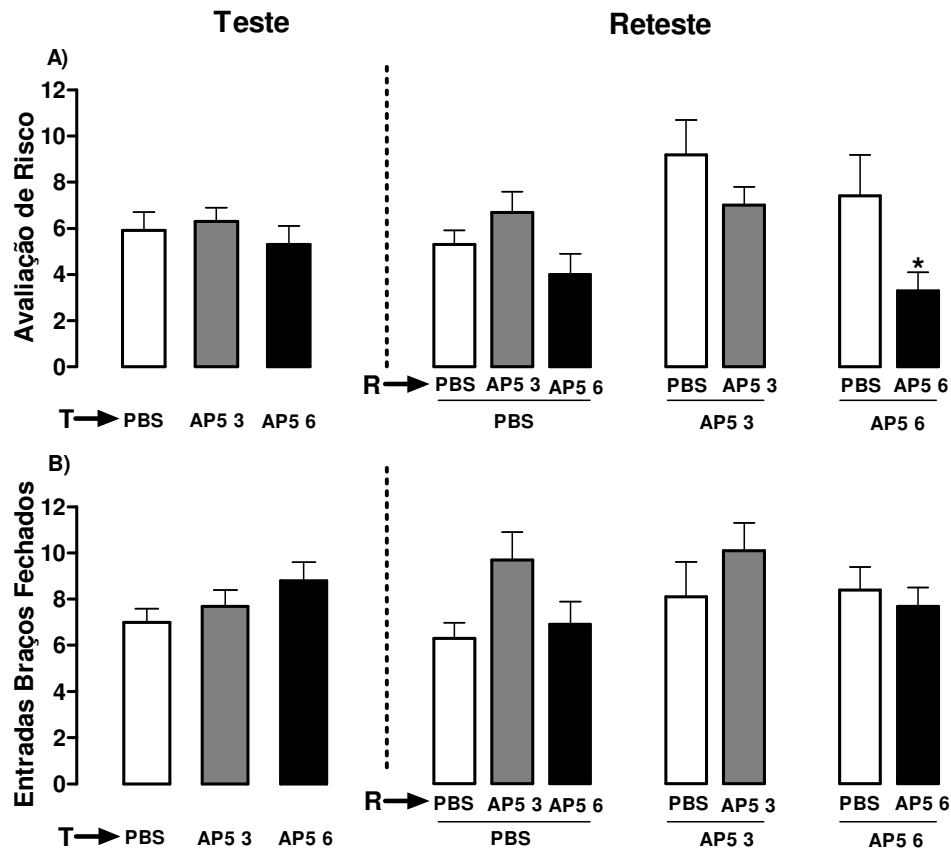


Figura 9. Efeito da microinjeção de AP5 3 e 6 nmol na SCPd, em ratos expostos ao teste e reteste no LCE, sobre o número de EBF (A) e avaliação de risco (B). Os dados são expressos na forma de média \pm EPM ($n = 7-12$). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. R \rightarrow Tratamento antes do reteste. T \rightarrow Tratamento antes do teste.

4.3.2. Experimento 2:

As Figuras 10 e 11 ilustram o efeito da microinjeção de Ifenprodil 0,5 ou 1 nmol na SCPd sobre o comportamento observado em ratos submetidos ao teste e ao reteste no LCE.

O número de ratos utilizados neste experimento foi: PBS/PBS, 6; PBS/Ifen 0,5 nmol, 9; PBS/Ifen 1 nmol, 7; Ifen 0,5 nmol/PBS, 8; Ifen 0,5 nmol/Ifen 0,5 nmol, 8; Ifen 1 nmol/ PBS, 11 e Ifen 1 nmol/Ifen 1 nmol, 9.

A ANOVA revelou efeito do tratamento com Ifenprodil na % TBA [$F(2,55) = 3,185$; $p = 0,049$] e na %EBA [$F(2,55) = 5,635$; $p = 0,006$] durante o teste no LCE. A Análise *post-hoc* mostrou aumento na %TBA e na % EBA do grupo que recebeu a microinjeção de Ifenprodil 1 nmol (Ifen 1) na SCPd em relação ao grupo controle (PBS). Portanto, estes resultados demonstraram que o bloqueio seletivo da subunidade NR-2B dos receptores glutamatérgicos NMDA com Ifenprodil 1 nmol aumentou o comportamento exploratório dos ratos nos braços abertos durante o teste no LCE, sugerindo, efeito tipo-ansiolítico no LCE (Fig. 10).

Durante o reteste, a ANOVA mostrou efeito significativo na %TBA para o fator tratamento [$F(6,51) = 2,904$; $p = 0,016$], para o fator repetição [$F(1,51) = 42,525$; $p = 0,001$] e para a interação entre estes dois fatores [$F(6,51) = 2,753$; $p = 0,021$]. Da mesma maneira, a ANOVA também mostrou efeito significativo na %EBA para o fator tratamento [$F(6,51) = 3,805$; $p = 0,003$], para o fator repetição [$F(1,51) = 48,036$; $p = 0,001$] e para a interação entre estes dois fatores [$F(6,51) = 3,240$; $p = 0,009$].

Para os animais que receberam PBS na SCPd antes do teste e Ifenprodil 1 nmol antes do reteste, a análise *post-hoc* indicou um aumento significativo na %TBA e na %EBA durante o reteste quando comparado ao seu

controle experimental (o grupo que recebeu PBS antes do teste e do reteste). A análise *post-hoc* revelou ainda uma tendência ($p= 0,05703$) na redução da %TBA durante o reteste, dos animais que receberam PBS antes do teste e Ifenprodil 0,5 nmol antes do reteste quando comparado ao seu próprio desempenho no dia do teste do LCE.

Para os animais microinjetados na SCPd com Ifenprodil 0,5 nmol antes do teste e PBS ou Ifenprodil 0,5 nmol antes do reteste, a análise *post-hoc* revelou uma redução significativa na %TBA e na %EBA durante o reteste quando comparado ao seu próprio desempenho no dia do teste do LCE. Esses dois grupos não apresentaram diferenças significantes entre si nos parâmetros analisados acima no reteste. As mesmas diferenças descritas acima foram observadas para a dose de Ifenprodil 1 nmol.

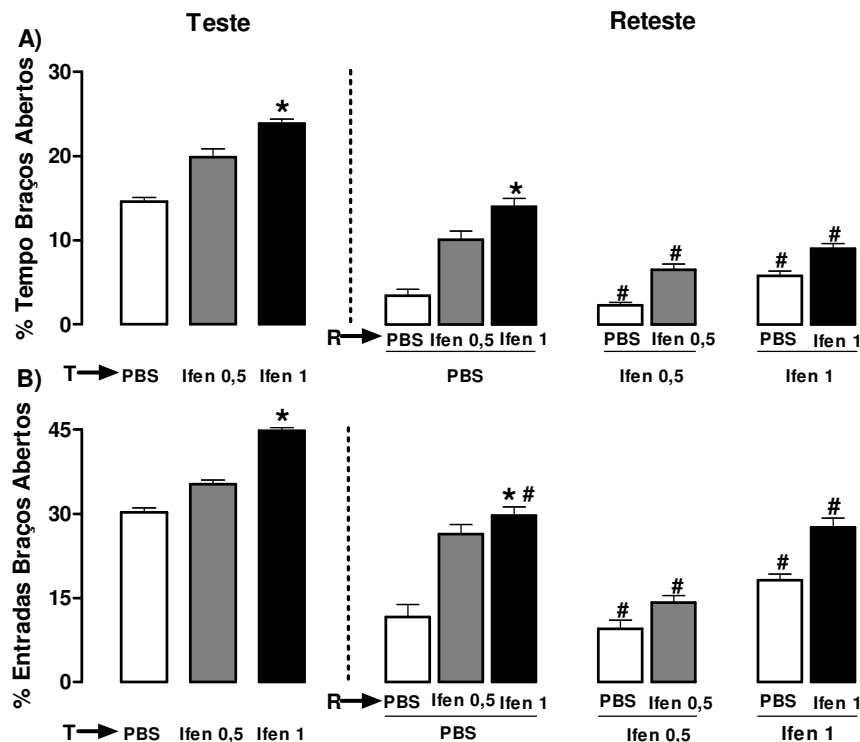


Figura 10. Efeito da microinjeção de Ifenprodil 0,5 e 1 nmol na SCPd, em ratos, sobre a atividade nos braços abertos no teste e no reteste do LCE. Os dados estão representados como média \pm EPM ($n= 8-11$). * $p< 0,05$ comparado ao grupo controle, # $p< 0,05$ comparado respectivo grupo no teste. R \rightarrow Tratamento antes do reteste. T \rightarrow Tratamento antes do teste.

A ANOVA não mostrou efeito significativo para o fator tratamento nem nas EBF [$F(2,55) = 1,102$; $p = 0,369$], nem para o parâmetro de avaliação de risco [$F(2,55) = 1,192$; $p = 0,311$] durante o teste.

No reteste, A ANOVA não mostrou efeito significativo nas EBF para o fator tratamento [$F(6,51) = 2,027$; $p = 0,079$] ou para a interação entre o fator tratamento e repetição [$F(6,51) = 1,415$; $p = 0,227$]. Entretanto, para o valor repetição a ANOVA mostrou diferença significativa [$F(1,51) = 8,392$; $p = 0,006$]. O teste *post-hoc* indicou um aumento na EBF durante o reteste quando comparado ao desempenho no dia do teste, em dois grupos experimentais: no grupo que recebeu PBS antes do teste e Ifenprodil 1 nmol antes do reteste e no grupo que recebeu Ifenprodil 0,5 nmol antes do teste e reteste. Este último grupo também apresentou um aumento significativo durante o reteste quando comparado ao seu controle experimental (o grupo que recebeu Ifenprodil antes do teste e PBS antes do reteste). O teste *post-hoc* revelou ainda uma tendência ($p = 0,062$) de aumento na EBF no grupo que recebeu Ifenprodil 1 nmol antes do teste e reteste quando comparado ao seu próprio desempenho no dia do teste (Fig. 11B).

No parâmetro de avaliação de risco a ANOVA não mostrou diferença significativa para o fator tratamento [$F(6,51) = 1,328$; $p = 0,262$] e para a interação entre o fator tratamento e repetição [$F(1,51) = 1,220$; $p = 0,311$] durante o reteste. A ANOVA mostrou diferença significante no fator repetição [$F(1,51) = 6,727$; $p = 0,012$] durante o reteste. A análise *post-hoc* revelou um aumento do parâmetro de avaliação de risco no grupo que recebeu Ifenprodil 1 nmol antes do teste e PBS antes do reteste quando foi comparado com o seu próprio desempenho no dia do teste (Fig. 11 A).

Desta forma, o aumento da atividade nos braços abertos durante o reteste após a microinjeção de Ifenprodil 1 nmol foi observado na ausência de efeitos sobre a atividade locomotora, representado pelas EBF, deste grupo.

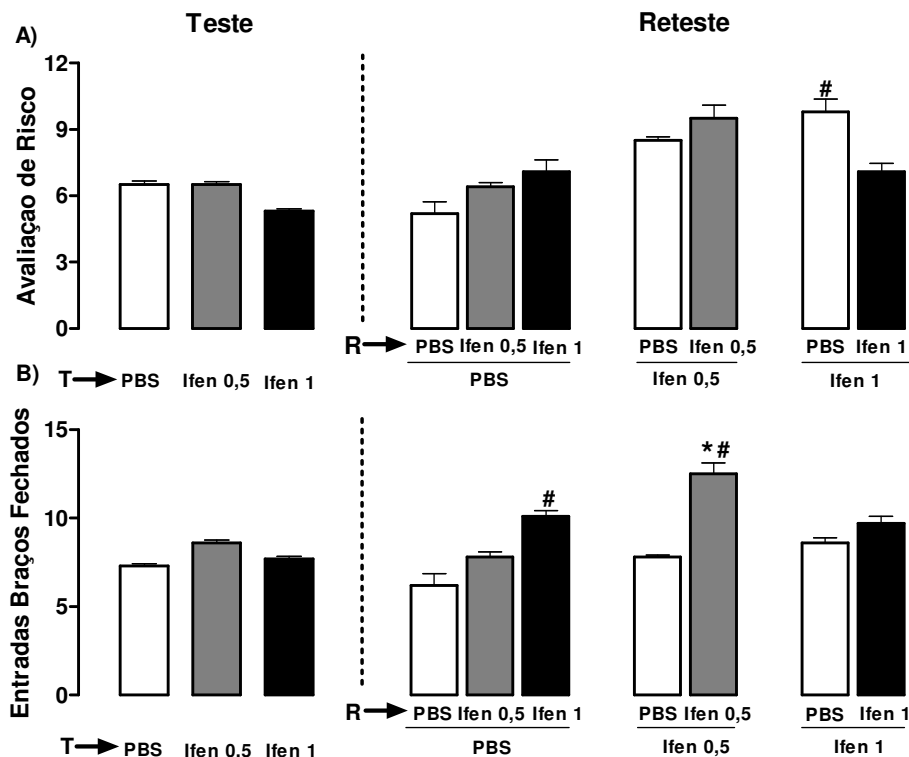


Figura 11. Efeito da microinjeção de Ifenprodil 0,5 e 1 nmol na SCPd, em ratos expostos ao teste e reteste no LCE, sobre a avaliação de risco (A) e o número de EBF (B). Os dados são expressos na forma de média \pm EPM (n= 8-11). * comparado ao grupo controle, # p< 0,05 comparado ao respectivo grupo no teste. R \rightarrow Tratamento antes do reteste. T \rightarrow Tratamento antes do teste.

4.3.3. Experimento 3:

No experimento 3, a dose de AP5 3 nmol foi selecionada para verificar a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd na consolidação da esquia aprendida aos braços abertos, observada durante o reteste.

A ANOVA não revelou diferença significativa na %EBA [F(1, 11)= 0,062; p= 0,808], %TBA [F(1, 11)= 0,034; p= 0,856], Avaliação de Risco [F(1,

11)=1,959; $p= 0,189$] e EBF [$F(1, 11)= 0,467$; $p= 0,508$] durante o teste dos ratos microinjetados com AP5 3 nmol na SCPd imediatamente após o teste.

No reteste a ANOVA indicou diferenças na %TBA para o fator repetição [$F(1, 11)=23,782$; $p= 0,005$], porém não revelou diferenças no fator tratamento [$F(1, 11)= 0,012$; $p= 0,916$] e para a interação destes fatores [$F(1, 11)= 0,428$, $p= 0,526$]. Da mesma maneira, a ANOVA indicou diferença somente no fator repetição na % EBA [$F(1, 11) = 18,070$; $p= 0,001$]. A análise *post hoc* revelou uma redução na %TBA e %EBA dos grupos no reteste, em relação ao teste.

A ANOVA não revelou efeito significativo nas EBF para o fator tratamento [$F(1, 11)= 0,578$; $p= 0,463$], fator repetição [$F(1, 11)=2,534$; $p= 0,140$] e interação entre estes fatores [$F(1, 11)= 0,011$; $p= 0,917$] durante o reteste. Da mesma forma, não foi observado diferenças significativas no parâmetro de avaliação de risco para o fator tratamento [$F(1, 11)= 0,011$; $p= 0,917$], fator repetição [$F(1, 11)= 0,020$; $p= 0,889$] e interação entre estes fatores [$F(1, 11)= 0,154$; $p= 0,702$] durante o reteste.

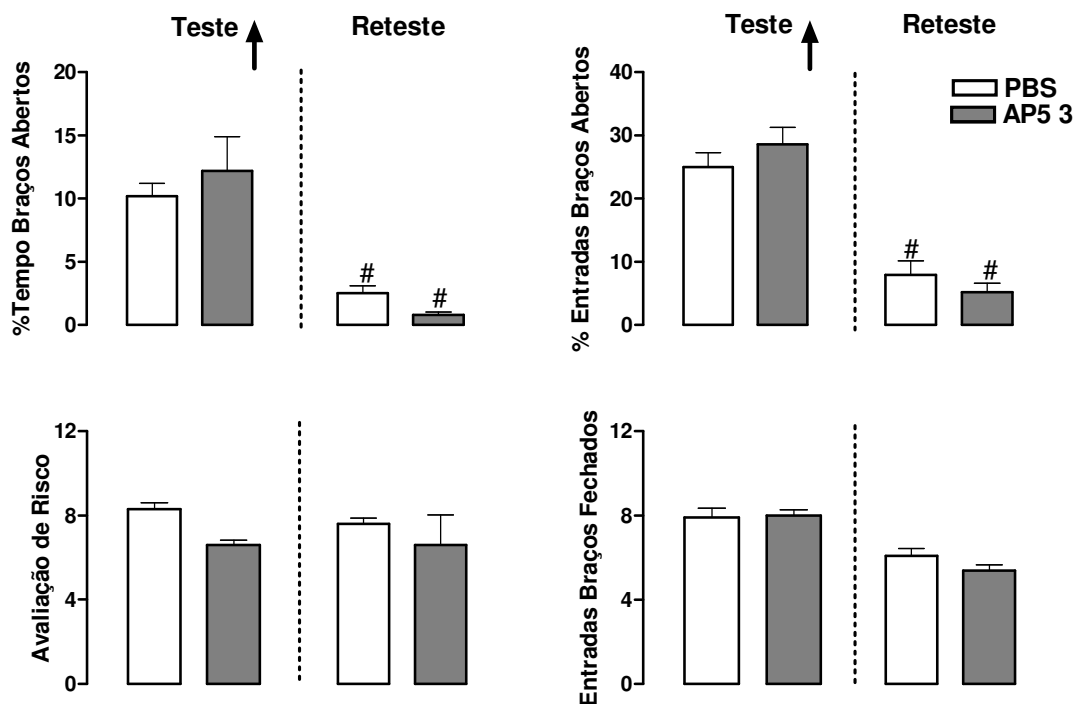


Figura 12. Efeito da microinjeção de AP5 3 nmol na SCPd, imediatamente após o teste, em ratos submetidos ao teste e reteste no LCE. Os dados são expressos na forma de média \pm EPM (n=7, PBS; n=6, AP5). # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo no teste. ↑ Tempo da microinjeção: imediatamente após o teste.

4.4. Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd na aquisição, consolidação e expressão do medo aprendido na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA.

Com o intuito de verificar a participação da SCPd nas respostas emocionais aprendidas foram realizadas manipulações farmacológicas na SCPd utilizando como modelo experimental o aparato da esQUIVA INIBITÓRIA tipo Step Down.

A figura 13 A representa os resultados do tratamento com AP5 6 nmol e PBS na etapa de aquisição da resposta defensiva no modelo da esQUIVA INIBITÓRIA. O teste de Mann Whitney não mostrou diferença significativa, entre os animais que receberam AP5 6 nmol ou PBS na latência de descida da plataforma durante o teste ($p = 0,622$) ou durante o reteste ($p = 0,747$). O teste de Wilcoxon mostra diferença significativa entre as sessões de teste e reteste

nos animais que receberam PBS ($p= 0,028$) e AP5 6 nmol ($p= 0,001$). Portanto, estes resultados sugerem que os animais exibem um comportamento de esquiva não prejudicado pela administração de AP5 6 nmol na SCPd.

Para a análise dos resultados descritos abaixo, a latência de descida da plataforma dos grupos durante o teste foi agrupada na figura 13B e 13C porque a manipulação farmacológica foi realizada somente após o teste, além de não haver diferença estatística.

A fim de se verificar os efeitos do bloqueio competitivo dos receptores NMDA do glutamato na SCPd sobre a consolidação de memórias aversivas, AP5 6 nmol foi administrado imediatamente após a realização do condicionamento (teste) no aparato da esquiva inibitória. A figura 13B representa os resultados do tratamento com AP5 na SCPd sobre a etapa de consolidação no modelo da esquiva inibitória. O teste Mann Whitney não mostrou diferença significativa do tratamento na latência de descida durante o teste ($p= 0,322$) e durante o reteste ($p= 0,203$). O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa entre as sessões de teste e reteste nos animais que receberam PBS ($p= 0,001$) e AP5 6 nmol ($p= 0,001$). Portanto, estes resultados mostram que os animais exibem um comportamento de esquiva e que a administração de AP5 imediatamente após o teste não prejudicou a consolidação deste aprendizado.

Para avaliar o efeito do bloqueio dos receptores de glutamato do tipo NMDA na expressão do medo aprendido no modelo da esquiva inibitória foi microinjetado AP5 3 e 6 nmol na SCPd antes do reteste deste modelo. A figura 13C representa os resultados do tratamento com AP5 3 e 6 nmol na SCPd sobre a etapa de evocação do condicionamento aversivo no modelo da esquiva inibitória. O teste de Kruskal Wallis revelou uma diferença significativa do

tratamento na latência de descida durante o reteste [$H(3,39) = 15,935$; $p = 0,001$], mas não durante o teste [$H(3,39) = 6,023$; $p = 0,111$]. O teste U de Mann Whitney revelou redução da latência de descida da plataforma durante o reteste dos animais tratados com AP5 3 nmol ($p = 0,004$) e AP5 6 nmol ($p = 0,001$) em relação ao grupo controle. O teste de Wilcoxon mostra diferença significativa entre as sessões de teste e reteste nos animais que receberam PBS ($p = 0,003$), e uma tendência nos animais que receberam AP5 3 nmol ($p = 0,061$) e AP5 6 nmol ($p = 0,070$). Portanto, estes resultados mostram que os animais microinjetados com AP5 antes do reteste não exibiram o aprendizado de esquiva inibitória quando comparados com os animais controle, indicando assim, que a administração de AP5 na SCPd é capaz de prejudicar a expressão do medo aprendido no modelo da esquiva inibitória.

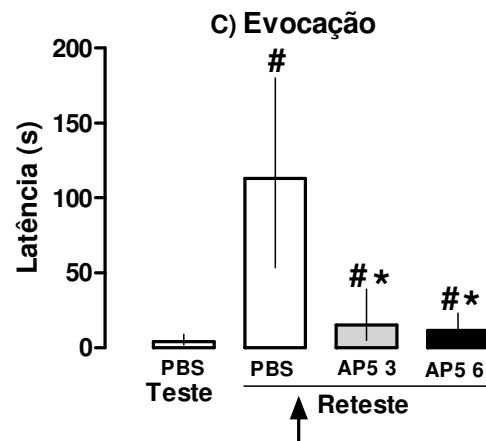
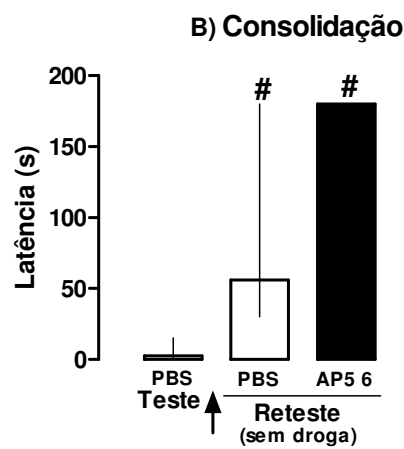
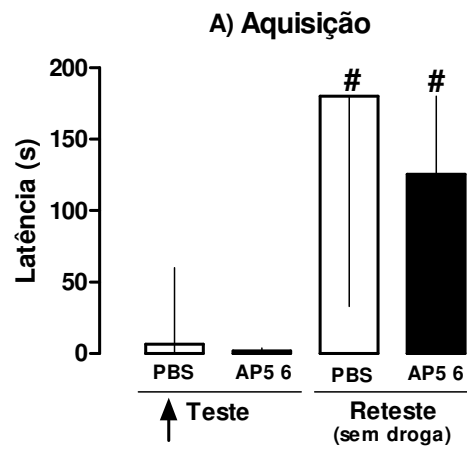


Figura 13. Efeito da microinjeção de AP5 na SCPd sobre a aquisição (A), consolidação (B) e evocação (C) do condicionamento aversivo no modelo da esQUIVA INIBITÓRIA. Os dados estão representados sob a forma de mediana e intervalo interquartil superior e inferior (n=7-15). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Kruskal Wallis). # $p < 0,05$ comparando ao teste (teste de Wilcoxon). ↑Tempo da Microinjeção: 10 min antes do teste (A), imediatamente após o teste (B) e antes do reteste (C).

Para avaliar o efeito do bloqueio dos receptores de glutamato NMDA, seletivo para a subunidade NR_{2B}, na expressão do medo aprendido no modelo da esquia inibitória foi microinjetado na SCPd Ifenprodil, um antagonista seletivo para a subunidade NR_{2B}.

Para a análise destes resultados a latência de descida da plataforma dos grupos durante o teste foi agrupada, adotando o mesmo procedimento descrito anteriormente. A figura 14 representa os resultados do tratamento com Ifenprodil 0,5 e 1 nmol na etapa de evocação do condicionamento aversivo no modelo da esquia inibitória. O teste Kruskal-Wallis revelou uma diferença significativa do tratamento na latência de descida durante o reteste [$H(2,40) = 14,174$; $p = 0,001$], mas não durante o teste [$H(2,40) = 2,767$; $p = 0,251$]. O teste de Mann Whitney U demonstra a redução da latência de descida da plataforma durante o reteste dos animais que receberam 1 nmol ($p = 0,000216$) em relação ao grupo controle. A latência de descida da plataforma no dia do reteste dos ratos que receberam Ifenprodil 0,5 nmol não foi diferente da latência de descida do grupo controle ($p = 0,732$). O teste de Wilcoxon mostra diferença significativa entre as sessões de teste e reteste nos animais que receberam PBS ($p = 0,001$), Ifenprodil 0,5 nmol ($p = 0,004$) e Ifenprodil 1 nmol ($p = 0,010$).

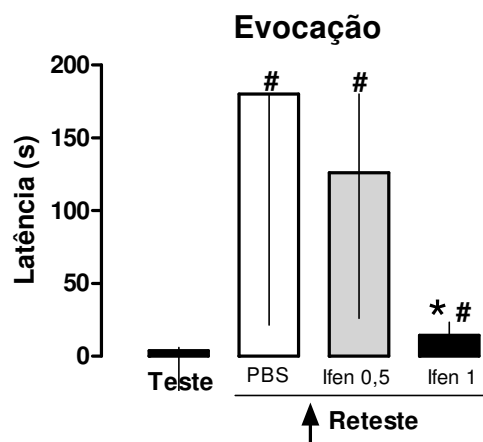


Figura 14. Efeito da administração do antagonista seletivo NR_{2B} NMDA Ifenprodil na SCPd sobre a evocação do condicionamento aversivo no modelo da esQUIVA inibitória. Os dados estão representados sob a forma de mediana e intervalo interquartil superior e inferior (n=12-16). * p< 0,05 comparado ao grupo controle (teste de Kruskal Wallis). # p< 0,05 comparando ao teste (teste de Wilcoxon). ↑Tempo da microinjeção: 10 minutos antes do reteste.

Portanto, estes resultados mostram que os animais administrados com Ifenprodil 1 nmol, antes do reteste, não exibiram o aprendizado de esQUIVA inibitória quando comparados com os animais controle, indicando assim, que a administração de Ifenprodil somente na dose de 1 nmol na SCPd foi capaz de prejudicar a expressão do medo aprendido no modelo da esQUIVA inibitória.

5. Discussão

O LCE é um dos testes comportamentais mais populares de emocionalidade em animais de laboratório. Contudo, apesar da considerável atenção direcionada ao entendimento deste modelo, aspectos como a mudança comportamental observada durante a reexposição ao mesmo modelo, ainda permanecem em debate (para revisão ver CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Esta mudança no perfil da exploração dentro e entre as sessões é observada também em nossos resultados experimentais com o LCE (Fig. 7). De maneira geral, os ratos exibiram uma redução gradual na atividade exploratória aos braços abertos que se iniciou nos primeiros minutos do teste e continuou durante o reteste, caracterizando a aquisição da esquia aos braços abertos. Esta mudança comportamental foi observada sem que ocorresse diferença entre as sessões nas entradas nos braços fechados, um índice da atividade locomotora dos animais (CRUZ *et al.*, 1994; RODGERS & JOHNSON, 1995), e no comportamento de avaliação de risco, parâmetro que reflete a tentativa do animal em explorar os braços abertos (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000), descartando desta forma, a idéia que o aumento da esquia aos braços abertos durante o reteste reflete meramente uma habituação locomotora (DAWSON *et al.*, 1994).

Modificações comportamentais entre o teste e reteste, bem como a tolerância ao efeito de drogas ansiolíticas induzida pela pré-exposição ao LCE, podem envolver diferentes estruturas cerebrais preferencialmente envolvidas no teste e no reteste ao LCE (BERTOGLIO *et al.*, 2005). Dentre elas, a substância cinzenta periaquedutal dorsal é uma estrutura crítica na seleção, organização e no comando das reações defensivas comportamentais e

neurovegetativas (FANSELOW, 1991). Esta estrutura participa da modulação do efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos e ansiogênico do PTZ no teste do LCE (DE SOUZA *et al.*, 1998; ANZINI, 2005), além da sua integridade ser fundamental na expressão da tolerância ao efeito ansiolítico em ratos pré-expostos ao LCE (BERTOGLIO *et al.*, 2005).

No presente estudo, o bloqueio competitivo dos receptores glutamatérgicos NMDA da SCPd com AP5 nas doses de 3 e 6 nmol antes do teste aumentou a %TBA e %EBA, sugerindo um efeito ansiolítico já observado previamente no LCE com a administração intra-SCPd de outros antagonistas NMDA (SCHIMITT *et al.* 1990; GUIMARÃES *et al.*, 1991; MATHEUS *et al.*, 1994; CAROBREZ *et al.*, 2001; MOLCHANOV & GUIMARÃES, 2002). Além do bloqueio competitivo dos receptores NMDA com AP5, o bloqueio seletivo da subunidade NR-2B destes receptores com Ifenprodil 1 nmol na SCPd antes do teste, também aumentou a %TBA e %EBA, corroborando o estudo de Fraser e colaboradores (1996) que mostraram o efeito ansiolítico do Ifenprodil administrado sistemicamente. Estes resultados foram observados na ausência de efeitos sobre a atividade exploratória geral, representada pelo número de entradas nos braços fechados.

Na reexposição ao LCE, as microinjeções com AP5 3 e 6 nmol e Ifenprodil 1 nmol antes do reteste também aumentaram a atividade exploratória aos braços abertos, sem alterar o número de EBF e a avaliação de risco. Portanto, o bloqueio competitivo, ou seletivo dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd inibiu a expressão do comportamento típico de esquia aprendida aos braços abertos durante a reexposição ao LCE e expressou um efeito tipo ansiolítico durante o reteste. Estes resultados sugerem que a atividade dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd contribuem

para a expressão da resposta de esquia aprendida aos braços abertos durante o reteste e que sua inativação resulta em um efeito ansiolítico observado tanto no teste como no reteste do LCE.

Bertoglio e colaboradores (2005), através da inativação reversível com lidocaína antes do reteste do LCE, demonstraram que a SCPdl participa do fenômeno da tolerância aos benzodiazepínicos resultante da reexposição no LCE. No entanto, ao contrário do que foi obtido neste estudo, a inativação geral da SCPdl por si só não teve efeito tipo-ansiolítico, sugerindo que a mesma atue somente reinstalando a resposta ansiolítica dos benzodiazepínicos.

Os dados apresentados neste trabalho mostram que a exposição prévia ao LCE não bloqueou o efeito ansiolítico obtido com a microinjeção de AP5 3 e 6 nmol e Ifenprodil 1 nmol na SCPd durante o reteste. Porém, quando os animais receberam AP5 3 nmol ou Ifenprodil 1 nmol antes do teste, apresentaram reduções na %TBA e na %EBA durante o reteste, que não foram inibidas mesmo após administração repetida destas drogas. Desta maneira, o efeito ansiolítico observado durante o reteste após a microinjeção de AP5 3 nmol e Ifenprodil 1 nmol foi bloqueado através da administração repetida destas drogas, sugerindo que a primeira exposição sob efeito destas drogas e o tratamento repetido das mesmas resultaram em tolerância do efeito ansiolítico durante o reteste.

O fenômeno da tolerância consiste na redução em certos efeitos farmacológicos de uma droga ao longo da exposição repetida a uma determinada dose, ou a necessidade de aumentar a dose da droga administrada para obter-se o mesmo efeito (MILLER & GOLD, 1990). No LCE, a tolerância ao efeito ansiolíticos dos antagonistas NMDA foi observada somente após a reexposição ao modelo, independentemente do tratamento

recebido antes do teste (salina ou antagonista NMDA) (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2003) e não através de administrações repetidas durante 2 dias (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2003) ou 7 dias (JESSA *et al.*, 1996) destas drogas. Cabe salientar ainda, que a administração repetida da maior dose de AP5 apresentou aumento significativo na porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos e redução no parâmetro de avaliação de risco, sugerindo o efeito ansiolítico do AP5 6 nmol durante o reteste, mesmo quando esta droga foi administrada duas vezes, ou seja, antes do teste e do reteste.

Em resumo, os principais resultados do experimento 1 e 2 sugerem a participação da SCPd no processo de evocação da resposta de esquiva aprendida durante o teste do LCE, uma vez que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd impediu a redução da atividade exploratória aos braços abertos durante o reteste, reinstalando o efeito ansiolítico deste tratamento. Em adição, estes resultados sugerem que o bloqueio dos receptores NMDA da SCPd durante o teste, além de resultar em um efeito ansiolítico, influencia a resposta comportamental observada durante o reteste. Esta influência é observada através dos resultados que demonstraram o fenômeno da tolerância ao efeito ansiolítico dos antagonistas NMDA neste trabalho.

Assim, como o AP5 3 e 6 nmol e o Ifenprodil 1 nmol intra-SCPd bloquearam a expressão da esquiva aos braços abertos durante o reteste no LCE, estes tratamentos também foram capazes de prejudicar a evocação da resposta de esquiva aprendida, quando microinjetados antes do reteste no modelo da esquiva inibitória. Sistemicamente, o bloqueio dos receptores NMDA com AP5 prejudicou a aquisição e consolidação, mas não a evocação da tarefa de esquiva inibitória (BAST *et al.*, 2005), da mesma forma que o Ifenprodil

interferiu nas mesmas etapas citadas acima no modelo de medo condicionado contextual e auditivo (RODRIGUES *et al.*, 2001). Porém, diferente do efeito observado na administração antes do teste do LCE, a qual modifica o efeito ansiolítico durante o reteste neste modelo, a microinjeção de AP5 6 nmol antes do teste no modelo da esQUIVA inibitória não interferiu na etapa de aquisição da resposta de esQUIVA no step down. Esta diferença observada na etapa de aquisição do aprendizado entre os modelos talvez se deva as diferenças no tipo e/ou no tempo de exposição ao estímulo ameaçador presente na etapa de condicionamento.

A SCP tem uma importante função na modulação da via descendente da dor (para revisão ver FIELDS & BASBAUM, 1994). Desta forma, uma possível redução da nocicepção ao choque pela microinjeção de AP5 antes do teste poderia interferir na resposta exibida durante o reteste no modelo de esQUIVA inibitória, já que a microinjeção de AP5 na SCPd reduziu a nocicepção no teste da formalina, mas não no teste da placa quente (VACCARINO *et al.*, 1997). Porém, neste estudo não foi observada alteração na sensibilidade ao choque, pois todos os animais que receberam infusão antes ou imediatamente após o teste não apresentaram prejuízo no desempenho no dia do reteste.

Portanto, estes resultados confirmam a participação da SCPd na expressão da resposta de esQUIVA condicionada no modelo de esQUIVA inibitória tipo step down e vão ao encontro com os dados da literatura que demonstraram um aumento na expressão da proteína Fos na SCP durante o reteste neste modelo (BABAI *et al.*, 2001).

O experimento 3 foi realizado para verificar se o bloqueio dos receptores NMDA com AP5 3 nmol, imediatamente após o teste, prejudicaria a consolidação das informações adquiridas durante o teste no LCE. Durante o

reteste os animais microinjetados com AP5 logo depois do teste não apresentaram nenhuma diferença na atividade exploratória geral em relação ao controle no reteste. Estes dados corroboram o estudo que utilizou lesão reversível com lidocaína na SCPdl depois do teste e não alterou nem o comportamento observado durante o reteste, nem o efeito da tolerância aos benzodiazepínicos a uma sessão (BERTOGLIO *et al.*, 2005).

O processo de consolidação envolve uma série de processos metabólicos em estruturas cerebrais especializadas visando à estabilização e armazenamento do aprendizado em uma memória de longo prazo (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). A aquisição e consolidação, no condicionamento aversivo contextual, são dependentes de estruturas cerebrais como a amígdala e o hipocampo, as quais estão amplamente envolvidas no processamento de informações emocionais (KIM & FANSELOW, 1993; PHILLIPS & LEDOUX, 1992; MAREN, 2001).

No LCE, a inativação reversível com lidocaína no núcleo basolateral da amígdala (BLA) depois do teste bloqueou o fenômeno de “One trial tolerance”, sem alterar a esquiva adquirida aos braços abertos. Nesse experimento, os animais que receberam salina sistêmica e lidocaína na BLA apresentaram redução da atividade exploratória nos braços abertos durante o reteste em relação ao teste, ou seja, a microinjeção de lidocaína na BLA depois do teste não alterou a esquiva adquirida durante o reteste (FILE *et al.*, 1998). Estes autores concluíram que o núcleo basolateral da amígdala era essencial para a consolidação das informações necessárias para a mudança da ansiedade no reteste, porém não essencial para a consolidação das outras informações que conduzem à resposta de supressão no reteste.

Trabalhos que utilizaram a manipulação farmacológica na formação hipocampal (hipocampo dorsal e ventral) imediatamente após o teste também não demonstraram a participação desta estrutura no processo de consolidação da esquiva aprendida aos braços abertos após uma pré-exposição ao LCE (NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2002; BERTOGLIO *et al.*, 2006; HÄCKL & CAROBREZ, in press).

Apesar dos nossos resultados com o bloqueio dos neurônios glutamatérgico da SCPd e dos dados da literatura com lesões reversíveis na SCPdl, formação hipocampal e BLA não demonstrarem prejuízo na consolidação da resposta aprendida de esquiva aos braços abertos no reteste do LCE, a participação destas estruturas na consolidação das informações adquiridas durante o teste não pode ser excluída. Isto porque dentro da sessão de 5 minutos do teste os animais parecem tanto adquirir as informações, principalmente nos primeiros minutos, como prontamente consolidar estas informações e já expressar nos dois últimos minutos do teste. Portanto, para interferir no processo de consolidação da estratégia defensiva adotada pelos animais no LCE, talvez a manipulação farmacológica deva ser feita depois dos primeiros minutos (do primeiro até o terceiro) da sessão, ou seja, antes do animal expressar a sua esquiva aos braços abertos.

Apesar dos dois testes comportamentais utilizados neste estudo exibirem características bem distintas em relação a natureza e o tempo de apresentação ao estímulo aversivo, a microinjeção de AP5 na SCPd não foi capaz de prejudicar a consolidação das respostas aprendidas, quando administrada imediatamente após o teste em ambos os modelos.

Em conjunto, nossos resultados reforçam a idéia que o sistema glutamatérgico da SCPd, via modulação dos receptores NMDA, está implicado

no comportamento tipo-ansiolítico em ratos. Além disso, mostram que o bloqueio dos receptores NMDA na SCPd prejudica a evocação das respostas aprendidas durante o teste tanto no LCE, quanto no modelo da esquiva inibitória. Porém, nossos dados não mostraram a participação das terminações glutamatérgicas da SCPd nos processos de aquisição e consolidação destas respostas, em ambos os modelos. De Oca e colaboradores (1998) sugeriram que o envolvimento da SCPd na aquisição e expressão das respostas defensivas deve-se a interferência desta estrutura no desempenho das respostas comportamentais e/ou atuando sobre outras estruturas mesencefálicas envolvidas no processamento das informações.L

Em resumo, nossos resultados sugerem que a SCPd é fundamental tanto na expressão das respostas defensivas exibidas frente a situações ameaçadoras, quanto no processo de evocação das respostas defensivas aprendidas. Desta maneira, ao considerar os transtornos de ansiedade uma evocação excessiva ou inadequada das respostas defensivas, a SCPd parece desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento destes transtornos.

6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos com este trabalho conclui-se que:

- O bloqueio competitivo dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd, bem como o bloqueio seletivo da subunidade NR_{2B} destes receptores, ocasionam um aumento do comportamento exploratório dos braços abertos, relacionado ao comportamento tipo-ansiolítico em ratos, durante o teste no LCE.

- A microinjeção do antagonista competitivo ou seletivo NR_{2B} dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na SCPd aumentou a atividade exploratória aos braços abertos de ratos durante o reteste no LCE, ou seja, inibiu a expressão do comportamento clássico de esquiva aprendida aos braços abertos durante a reexposição ao LCE.

- A administração repetida de AP5 3 nmol e Ifenprodil 1 nmol antes do teste e antes do reteste foi capaz de induzir tolerância ao efeito ansiolítico observado durante o reteste no LCE.

- O bloqueio dos receptores NMDA na SCPd não prejudicou os processos de aquisição e consolidação da resposta de esquiva aos braços abertos exibida no reteste do LCE.

- O bloqueio competitivo ou seletivo da subunidade NR_{2B} dos receptores NMDA prejudicou a expressão da evocação da esquiva inibitória, mas não interferiu com as etapas de aquisição ou consolidação da tarefa de esquiva inibitória.

7. Referências Bibliográficas

Albin, R.L.; Makowiec, R.L.; Hollingsworth, Z.; Dure, L.S.; Penney, J.B.; Young, A.B. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. *Neurosci. Lett.*, 2:118(1):112-5, 1990.

Almeida, S.S.; Garcia, R.A.; de Oliveira, L.M. Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 54(4):749-52, 1993.

Altamura, C.; Maes, M.; Daí, J.; Meltzer, H.Y. Plasma concentrations of excitatory amino acids, serine, glycine, taurine and histidine in major depression. *Eur. Neuropsych.* 5 Suppl:71-5, 1995.

An, X.; Bandler, R.; Ongur, D.; Price, J. L. Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.* 401:455– 479, 1998.

Andreatini, R.; Bacellar, L.F. Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. *Prog. Neuropsych. Biol Psychiatry.* 24(4):549-60, 2000.

Anzini, C. Participação da substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral na modulação da efeito ansiogênico do pentilenotetrazol em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

Babai, P.; Anokhin, K.V.; Dolgov, N.; Sudakov, K.V. Characteristics of c-fos gene expression in the brains of rats with different investigative and defensive behaviors. *Neurosci Behav Physiol.* 31(6):583-8, 2001.

Bandler, R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for midbrain periaqueductal gray region. *Prog Psychobiol Physiol Psychol* 13:67-222, 1988.

Bandler, R.; Depaulis, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: Depaulis A, Bandler R (eds). *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, p.175-198, 1991.

Bandler, R.; Carrive, P.; Depaulis, A. Introduction - Emerging principles of organizations of the midbrain periaqueductal gray matter. In: Depaulis A, Bandler R (eds). *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, p.1-8, 1991a.

Bandler, R.; Carrive, P.; Zang, S.P. Integration of somatic in the autonomic reactions within the midbrain periaqueductal gray: vicerotopic, somatotopic and functional organization. *Prog Brain Res.* 87:269-305, 1991b.

Bandler, R.; Keay, K. A Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog Brain Res.* 107:285-300, 1996.

Bandler, R.; Keay, K.A.; Floyd, N.; Price, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull.* 1;53(1):95-104, 2000.

Barros, D.M.; Izquierdo, L.A.; Mello e Souza, T.; Ardenghi, P.G.; Pereira, P.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behav Brain Res.* 114(1-2):183-92, 2000.

Bast, T.; da Silva, B.M.; Morris, R.G. Distinct contributions of hippocampal NMDA and AMPA receptors to encoding and retrieval of one-trial place memory. *J. Neurosci.* 25, 5845–5856, 2005.

Behbehani, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol.* 46(6):575-605, 1995.

Beitz, A.J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rats. *Neurosci.* 7:133-159, 1982.

Beitz, A.J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. *J Comp Neurol.* 1985 22;237(4):445-59, 1985.

Beitz, A.J. Periaqueductal gray. In: Paxinos G (ed). *The rat nervous system.* Second edition. San Diego: Academic Press, p.173-182, 1995.

Bennett, D.A.; Amrick, C.L. Antagonists at the N-methyl-D-aspartate receptor produce anticonflict effects. In: *Excitatory amino acid transmi.* New York, 213-216, 1987.

Benveniste, M.; Mayer, M.L. Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine. *Biophys J.* 59(3):560-73, 1991.

Bertoglio, L.J.; Carobrez, A.P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav Brain Res.* 108(2):197-203, 2000.

Bertoglio, L.J.; Carobrez, A.P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 72(1-2):449-55, 2002a.

Bertoglio, L.J.; Carobrez, A.P. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 73(4):963-9, 2002b.

Bertoglio, L.J.; Carobrez, A.P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav Brain Res.* 14;132(2):135-43, 2002c.

Bertoglio, L.J.; Carobrez, A.P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptors ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. *Psychopharm.* 170(4):335-342; 2003.

Bertoglio, L.J.; Carobrez, A.P. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2, *Behav Pharmacol* 15 pp. 45-54, 2004.

Bertoglio, L.J.; Anzini, C.; Lino-de-oliveira, C.; Carobrez, A.P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Behav BrainRes.* 1;162(1):99-107, 2005.

Bertoglio, L.J.; Zangrossi H. Jr. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. *Behav Pharmacol.* 17(7):589-96, 2006.

Bertoglio, L.J.; Joca, S.R.; Guimaraes, F.S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav Brain Res.* 25;175(1):183-8, 2006.

Bigge, C.F. Ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Chem Biol.* 3(4):441-7, 1999.

Bittencourt, A.S.; Nakamura-Palacios, E.M.; Mauad, H.; Tufik, S.; Schenberg, L.C. Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 133 (4), 873- 892, 2005.

Blanchard, R.J.; Blanchard, D.C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog Neuropsych Biol Psychiatry.* 13 Suppl:S3-14, 1989.

Blanchard, R.J.; Blanchard, D.C. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* Winter;14(4):463-72, 1990.

Blanchard, R.J., Blanchard, D.C. Crouching as an index of fear. *J. Comp. Physiol. Psych.* 67, 370-375, 1969.

Blanchard, D.C.; Blanchard, R.J.; Carobrez, A.P.; Veniegas, R.; Rodgers, R.J.; Sheperd, J.K. MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior. *Psychoph.* 108:352-362; 1992.

- Blanchard, D.C.; Griebel, G.; Blanchard, R.J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Progress in Neuro-Psychoph & Biol Psych.* 27: 1177– 1185, 2003.
- Bliss, T.V.; Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 7;361(6407):31-9, 1993.
- Brandão, M.L.; Fontes, J.C.; Graeff, F.G. Facilitatory effect of ketamine on punished behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 13(1):1-4, 1980.
- Brandão, M.L.; Anseloni, V.Z.; Pandossio, J.E.; De Araujo, J.E.; Castilho, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1999;23(6):863-75. 1999.
- Cameron, A.A.; Khan, I.A.; Westlund, K.N.; Cliffer, K.D.; Willis, D. The efferent projections of periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgarisleucoagglutinin study. I. Ascending projections. *J Comp Neurol* 351(4):568-584, 1995.
- Canteras, N.S.; Goto, N. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport.* 5;10(2):413-8, 1999.
- Canto-de-Souza, A.; Luiz Nunes-de-Souza, R.;Rodgers, R.J. Anxiolytic- like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Res.* 22;928(1-2):50-9, 2002.
- Carobrez, A.P.; Schenberg, L.C.; Graeff, F.G. Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. *Physiol Behav* 31(4):439-444, 1983.
- Carobrez, A.P.; Teixeira, K.V.; Graeff, F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):697-709, 2001.
- Carobrez, A.P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. *Rev Bras Psiquiatr* 25(2):52-58, 2003.
- Carobrez, A.P.; Bertoglio, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(8):1193-205, 2005.
- Carrive, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res.* 58:27- 47, 1993.
- Carrive, P., Bandler, R. Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal gray: A correlative functional and anatomical study. *Brain Res.* 541: 206-215, 1991.
- Carrive, P.; Leung, P.; Harris, J.; Paxinos, G. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience.* 78(1):165-77, 1997.

Clements, J.D., Westbrook, G.L. Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron*. 7(4):605-13, 1991.

Collingridge, G.L.; Lester, R.A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol*. 41(2):143-210, 1989.

Conn, P.J.; Pin, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 37:205-37, 1997.

Corbet, R.; Dunn, R.R.W. Effects of 5,7 dichlorokynurenic acid on conflict, social interaction and plus-maze behaviors. *Neuropharmacology* 32 (5):461-466, 1993.

Cotman, C.W., Monaghan, D.T. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 11:61-80, 1988.

Cruz, A.P.; Frei, F.; Graeff, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 49(1):171-6, 1994.

Dal-Col, M.L.; Pereira, L.O.; Rosa, V.P.; Calixto, A.V.; Carobrez, A.P.; Faria, M.S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is independent on the length of Trial 1. *Pharmacol Biochem Behav*. 74(2):395-400, 2003.

Day, H.E.; Masini, C.V.; Campeau, S. The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Res*. 29;1025(1-2):139-51, 2004.

Dawson, G.R.; Crawford, S.P.; Stanhope, K.J.; Iversen, S.D.; Tricklebank, M.D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychoph*. 113(3-4):570-2, 1994.

De Oca, B.M.; DeCola, J.P.; Maren, S.; Fanselow, M.S. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J Neurosci*. 1;18(9):3426-32, 1998.

De-Souza, M.M.; Schenberg, L.C.; Carobrez, A.P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. *Behav Brain Res* 90:157-165, 1998.

Dielenberg, R.A.; McGregor, I.S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosc and Biobeh Rev*. 25: 597-609, 2001.

Dielenberg, R.A.; Hunt, G. E.; McGregor, I.S. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience*. 104(4):1085-97, 2001.

Edwards, S.B.; Flynn, J.P. Corticospinal control of striking in centrally elicited attack behavior. *Brain Res.* 8;41(1):51-65, 1972.

Eisenberg, E.; Alon, N.; Ishay, A.; Daoud, D.; Yarnitsky, D. Lamotrigine in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Eur J Neurol.* 5(2):167-173, 1998.

Endler, J.A. Defence against predators. In: *Predatory-prey relationships*. University of Chicago Press, Chicago, p.109-134, 1986.

Fanselow, M.S. Conditioned and unconditional components of postshock freezing. *Pavlovian J. Biol. Sci.* 15 (4), 177–182, 1980.

Fanselow, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A & Bandler R (Editors), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. Plenum, New York. 1991.

Fanselow, M.S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon. Bull. Rev.* 1:429–38, 1994.

Fernandes, C.; File, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 54(1):31-40, 1996.

Fernandez-de-Molina, A.; Hunsperger, R.W. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. *J Physiol.* 3;145(2):251-65, 1959.

Fernandez-de-Molina, A.; Hunsperger, R.W. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. *J Physiol.* 3;145(2):251-65, 1962a.

Fernandez-de-Molina, A.; Hunsperger, R.W. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *J Physiol.* 160:200-13, 1962b.

Ferreira, M.B.; Wolfman, C.; Walz, R.; Da Silva, R.C.; Zanatta, M.S.; Medina, H.; Izquierdo, I. NMDA-receptor-dependent, muscimol-sensitive role of the entorhinal cortex in post-training memory processing. *Behav Pharmacol.* 3(4):387-391, 1992.

Fields, H.L.; Basbaum, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In P.D. Wall and R. Melzack (Eds.), *The Textbook of Pain*, Churchill Livingston, London. 243–257, 1994.

File, S.E. The history of benzodiazepine dependence: a review of animal studies. *Neurosci Biobehav Rev.* Summer. 14(2):135-46, 1990a.

File, S.E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharm.* 100(2):281-2, 1990b.

File, S.E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus maze. *Behav. Brain Res.* 58: 199-202, 1993.

File, S.; Mabbutt, P.S.; Hitchcott, P.K. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharm.* 102(1):98-101, 1990.

File, S.E.; Zangrossi, H. Jr. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze or the development of a phobic state? *Psychopharm.* 110(1-2):240-244, 1993.

File, S.E.; Zangrossi, H. Jr.; Viana, M.; Graeff, F.G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharm.* 111(4):491-4, 1993.

File, S.E.; Zangrossi, H. Jr.; Sander, F.L.; Mabbutt, P.S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharm.* 113(3-4):543-6, 1994.

File, S.E.; Gonzalez, L.E.; Gallant, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharm.* 19(5):397-405, 1998.

File, S.E.; Gonzalez, L.E.; Gallant, R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharm.* 21(2):312-20, 1999.

Fraser, C.M.; Cooke, M.J.; Fisher, A.; Thompson, I.D.; Stone, T.W. Interactions between ifenprodil and dizocilpine on mouse behaviour in models of anxiety and working memory. *Eur Neuropsychopharm.* 6(4):311-6, 1996.

Goebel, D.J.; Poosch, M.S. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res.* 8;69(2):164-70, 1999.

Gonzalez, L.E.; File, S.E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci.* 15;17(4):1505-11, 1997.

Gonzalez, L.E.; Ouagazzal, A.M.; File, S.E. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. *Eur J Neurosci.* 10(12):3673-80, 1998.

Graeff, F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz J Med Biol Res* 14:239-265, 1981.

Graeff, F.G. Brain defense system in anxiety. In: Roth M, Burrows GD, Noyes E (eds). *Handbook of anxiety*. Amsterdam: Elsevier, 3, 307-354, 1990.

Graeff, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res* 27(4):811-829, 1994.

Graeff, F.G., Carobrez, A.P., Silveira, M.C.L. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: Cavaleiro EA, Lehmann J, Turski L (eds). *Neurology and neurobiology*, vol 46. *Frontiers in excitatory amino acids research*. New York: Liss, p.325-332, 1988.

Gray, J. *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford. University Press, New York. 1982.

Gray, J.A.; McNaughton, N. *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford: Oxford University Press, pp. 1- 424, 2000a.

Gray, J.; McNaughton, N. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord.* 61(3): 161-76, 2000b.

Griebel, G.; Rodgers, R.J.; Perrault, G. Sanger, D.J. The free exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav Pharmacol.* 4(6):637-644, 1993.

Guimarães, F.G.; Carobrez, A.P.; De Aguiar, J.C.; Graeff, F.G. Anxiolytic effect on the plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharm.* 103: 91-94, 1990.

Guimarães, F.S.; Carobrez, A.P.; De Aguiar, J.C.; Graeff, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharm.* 103 (1):91-94, 1991.

Guimarães, F.S.; De-Aguiar, J.C.; Del Bel, E.A.; Ballejo, G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Neuroreport* 5:1929-1932, 1994.

Häckl, L.P.; Carobrez, A.P. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 effects revealed in the elevated plus-maze and in the one trial inhibitory avoidance tasks in rats, *Neurobiol. learn. Of Mem.* in press.

Handley, S.L.; Mithani, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327:1-5, 1984.

Hascoet, M.; Bourin, M.; Couetoux du Tertre, A. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacol Biochem Behav.* 58(4):1131-8, 1997.

Hetem, L.A.B.; Graeff, F.G. *Ansiedade e Transtornos de Ansiedade*. Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro, 1997.

Hollmann, M.; Heinemann, S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17:31-108, 1994.

Holmes, A.; Rodgers, R.J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav* 60(2):473-488, 1998.

Holmes, A.; Rodgers, R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* Nov;23(7):971-80, 1999.

Holmes, A.; Iles, J.P.; Mayell, S.J.; Rodgers, R.J. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behav Brain Res.* Aug 1;122(2):159-67, 2001.

Hunsperger, R.W. Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats. *Helv Physiol Pharmacol Acta.* 14(1):70-92, 1956.

Hunsperger, R.W. Affective behavior patterns elicited by electrical stimulation of the brain stem and forebrain. *J Physiol* 55:45-98, 1963.

Itoh, J.; Nabeshima, T.; Kameyama, T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharm.* 101(1):27-33, 1990.

Itoh, J.; Nabeshima, T.; Kameyama, T. Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur J Pharmacol.* 26;194(1):71-6, 1991.

Izquierdo, I.; Medina, J.H. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz J Med Biol Res.*;26(6):573-89, 1993.

Izquierdo, I.; Medina, J.H. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz J Med Biol Res.*;26(6):573-89, 1995.

Izquierdo, I.; Da Cunha, C.; Rosat, R.; Jerusalinsky, D.; Ferreira, M.B.; Medina, J.H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol.* 58(1):16-26, 1992.

Jansen, A.S.P.; Farkas, E.; Mac Sams, J.; Loewy, A.D. Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. *Brain Res.* 784:329-336, 1998.

Jessa, M.; Nazar, M.; Bidzinski, A.; Plaznik, A. The effects of repeated administration of diazepam, MK-801 and CGP 37849 on rat behavior in two models of anxiety. *Europeann Europsychopharm.* 6: 55-61, 1996.

- Kehne, J.H.; McCloskey, T.C.; Baron, B.M.; Chi, E.M.; Harrison, B.L.; Whitten, J.P.; Palfreyman, M.G. NMDA receptor complex antagonists have potential anxiolytic effects as measured with separation induced ultrasonic vocalization. *Eur. J. Pharmacol.* 193:283-292, 1991.
- Kemp, J.A.; Leeson, P. D. The glycine site of the NMDA receptor-- five years on. *Trends Pharmacol Sci.* 14(1):20-5, 1993.
- Kim, J.J.; Fanselow, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science.* 1;256(5057):675-7, 1993.
- Kim, J.J.; Rison, Kim, J.J.; Rison, R.A.; Fanselow, M.S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long term contextual fear. 107(6):1093-8, 1993.
- Klassen, J.J.; Williams, D.A.; Bolster, B.; Tait, R.W. Influence of dorsolateral periaqueductal grey (dIPAG) lesions on contextual conditioning with massed and distributed shock. *Q J Exp Psychol B.* 55(1):27-42, 2002.
- Kotlinska, J.; Liljequist, S. The putative AMPA receptor antagonist, LY326325, produces anxiolytic-like effects without altering locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 60(1):119-24, 1998.
- Krout, K.E.; Loewy, A.D. Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *Journ of Comp Neurol.* 424: 111-141, 2000.
- LeDoux, J.; Iwata, J.; Cicchetti, p.; Reis, D.J. Different Projections of the Central Amygdaloid Nucleus Mediate Autonomic and Behavioral Correlates of Conditioned Fear. *The Journal of Neurosci.* 8(7): 2517-2529, 1988.
- Leeson, P.D.; Iversen, L. L. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. *J Med Chem.* 25;37(24):4053-67, 1994.
- Lister, R.G. The use of a plus -maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharm.* 92: 180-185, 1987.
- Maren, S. Is there savings for pavlovian fear conditioning after neurotoxic basolateral amygdala lesions in rats? *Neurobiol Learn Mem.* 76(3):268-83, 2001.
- Matheus, M.G.; Nogueira, R.L.; Carobrez, A.P.; Graeff, F.G.; Guimarães, F.S. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey of the cat. *Psychopharm.* 113(3-4):565-569, 1994.
- Mathew, S.J.; Coplan, J.D.; Schoepp, D.D.; Smith, E.L.; Rosenblum, L.A.; Gorman, J.M. Glutamate/hypothalamic-pituitary-adrenal axis interactions: implications for mood and anxiety disorders. *CNS Spectr* 6:555–564, 2001.

McCulloch, J. Excitatory amino acid antagonists and their potential for the treatment of ischaemic brain damage in man. *Br J Clin Pharmacol.* 34(2):106-14, 1992.

McGregor, I.S.; Dielenberg, R.A. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 147(2):174-81, 1999.

McGregor, I.S., Schrama, L., Ambermoon, P., Dielenberg, R.A. Not all “predator odors” are equal: cat odor but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT: fox odor) elicits specific defensive behaviours in rats. *Behav. Brain Res.* 129 (1– 2), 1 – 16, 2002.

McNaughton, N.; Corr, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004 May;28(3):285-305, 2004.

Meldrum, B.S. Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. *Clin Sci.* 68(2):113-22, 1985.

Meldrum, B.S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J. Nutr.* 130:1007S-15S, 2000.

Miller, N.S.; Gold, M.S. Benzodiazepines: tolerance, dependence, abuse, and addiction. *J Psychoactive Drugs.* 22(1):23-33, 1990.

Miyazaki, S.; Imaizumi, M.; Machida, H. The effects of anxiolytics and anxiogenics on evaluation of learning and memory in an elevated plus-maze test in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 17(2):121-7, 1995.

Molchanov, M.L.; Guimarães, F.S. Anxiolytic-like effect of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 160(1):30-38, 2002.

Montgomery, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. *J Comp Neurol* 48:254-260, 1955.

Morris, R.G.; Anderson, E.; Lynch, G.S.; Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774–776, 1986.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. & Seeburg, P. H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529±540, 1994.

Nashold, B.S., Wilson, W.P., Slaughter, D.G. Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosur* 30:14-24, 1969.

Nauta, W.J.H. Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat brain. *Brain* 81:319-340, 1958.

- Nesse, R.M. Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. *Neurosc. Biobeh.* 23(7): 895-903, 1999.
- Nesse, R.M. The smoke detector principle. Natural selection and the regulation of defensive responses. *Ann. Ny Acad. Scic.* 935: 75-85, 2001.
- Nesse, R.M. Evolutionary biology: a basic science for psychiatry. *World Psychiatry* 1(1): 7-9, 2002.
- Newman, D.B.; Hileary, S.K.; Ginsberg, C.Y. Nuclear terminations of corticonuclear fiber systems in rats. *Brain, Behav and Evol*, 34: 223-264, 1989.
- Nunes de Souza, R.L.; Canto-de-Souza, A; Rodgers, R.J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. *Brain Res.* 8;927(1):87-96, 2002.
- Pandossio, J.E.; Brandão, M.L. Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate receptors in the inferior colliculus of rats. *Psychopharmacology* 142(4):360-8, 1999.
- Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, fourth edition. San Diego: Academic Press. 1998.
- Pellow, S.; File, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 24(3):525-9, 1986.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 14:149-167, 1985.
- Perreira, J.K.; Vieira, R.J.; Konishi, C.T.; Ribeiro, R.A.; Frussa-Filho, R. The phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sci.* 65(10):PL101-7, 1999.
- Phillips, R.G.; Ledoux, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci.* 106(2):274-85, 1992.
- Quevedo, J.; Vianna, M.; Zanatta, Roesler, M.S.; Izquierdo, I.; Jerusalinsky, D.; Quilfeldt, A. Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behav Pharmacol.* 8(8):713-7, 1997.
- Risold, P.Y.; Thompson, R.H.; Swanson, L.W. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 24: 197-254, 1997.
- Rodgers, R.J.; Shepherd, J.K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharm.* 113(2):237-42, 1993.

Rodgers, R.J.; Cole, F.C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol Behav.* 54(4):729-36, 1993.

Rodgers, R.J.; Cole, F.C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper SJ, Hendrie CA (eds). *Ethology and Psychopharm.* New York: Wiley, p.9-44, 1994.

Rodgers, R.J.; Johnson, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 52(2):297-303, 1995.

Rodgers, R.J.; Dalvis, A. Anxiety, defence and the elevated plus- maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 21(6):801-10, 1997.

Rodgers, R.J.; Lee, C.; Shepherd, J.K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharm.* 106(1):102-10, 1992.

Rodgers, R.J.; Cole, J.C.; Aboualfa, K.; Stephenson, L.H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 52(4):805-13, 1995.

Rodgers, R.J.; Johnson, N.J.T.; Cole, J.C.; Dewa, C.V.; Kidd, G.R.; Kimpson, P.H. Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 54:41-50, 1996.

Rodrigues, S.M.; Schafe, G.E.; LeDoux, J.E. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci.* 1;21(17):6889-96. Erratum in: *J Neurosci.* 15;22(22):1A, 2001.

Rossetti, Z.L.; Carboni, S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur J Pharmacol.* 5;283(1-3):177-83, 1995.

Russo, A.S.; Guimarães, F.S.; De-Auiar, J.C.; Graeff, F.G. Anxiolytic effect of midazolam microinjected into the dorsal periaqueductal grey area of rats. *Braz J Med Biol Res* 24(6):607-609, 1991.

Russo, A.S.; Guimarães, F.S.; De-Auiar, J.C.; Graeff, F.G. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray in anxiety. *Psychopharm.* 110:198-202, 1993.

Sandkuhler, J.; Herdegen, T. Distinct patterns of activated neurons throughout the rat midbrain periaqueductal gray induced by chemical stimulation within its subdivisions. *J Comp Neurol* 357(4):546-553, 1995.

Santos, P.; Bittencourt, A.S.; Schenberg, L.C.; Carobrez, A.P. Elevated T-maze evaluation of anxiety and memory effects of NMDA/glycine-B site ligands injected into the dorsal periaqueductal gray matter and the superior colliculus of rats. *Neuropharm.* 51(2):203-12, 2006.

Schenberg, L.C.; Graeff, F.G. Role of periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 9:287- 295, 1978.

Schmitt, M.L.; Graeff, F.G.; Carobrez, A.P. Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter of rats placed in the elevated plus maze test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23: 677-679, 1990.

Schmitt, M.L.; Coelho, W.; Lopes-de-Souza, A.S.; Guimarães, F.S.; Carobrez, A.P. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Neurosci. Lett.* 189: 93-96, 1995.

Sharma, A.C.; Kulkarni, S.K. Evaluation of learning and memory mechanisms employing elevated plus-maze in rats and mice. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 16(1):117-25, 1992.

Stephens, D.N.; Meldrum, B.S.; Weidmann, R.; Schneider, C.; Grutzner, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? *Psychopharm.* 90(2):166-169, 1986.

Sudré, E.C.; Barros, M.R.; Sudré, G.N.; Schenberg, L.C. Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. *Behav Brain Res.* 20;58(1-2):141-54, 1993.

Teixeira, K.V. Participação dos receptores NMDA/GLYB da substância cinzenta periaquedutal dorsal na mediação do comportamento defensivo de ratos. Tese (doutorado em farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2002.

Teixeira, K.V.; Carobrez, A.P. Effects of glycine or 3-amino-1- hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behav Neurosci* 113:196-203, 1999.

Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav* 44(2):463-469, 1993.

Trullas, R.; Jackson, B.; Skolnick, P. Anxiolytic properties of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid, a ligand at strychnine insensitive glycine receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 34:313-316, 1989.

Vaccarino, A.L.; Clemmons, H. L.; Gary, J.; Mader, Jr.; Magnusson J.E. A role of periaqueductal grey NMDA receptors in mediating formalin-induced pain in the rat. *Neurosc Letters.* 236:117–119, 1997.

Vertes, R.P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *Jour of Compar Neurol.* 313: 643-668, 1991.

Vianna, D.M.; Brandão, M.L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Braz J Med Biol Res.* 36(5):557-66, 2003.

Vianna, D.M.; Graeff, F.G.; Landeira-Fernandez, J.; Brandão, M.L. Dorsal Periaqueductal Gray Fear but Does Not Change Freezing Induced by Stimulation of the Lesion of the Ventral Periaqueductal Gray Reduces Conditioned. *Learn. Mem.* 8: 164-169, 2001.

Walker, D.L.; Davis, M. Involvement of dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. *Behav Neurosci* 111:692-702, 1997.

Walker, P.; Carrive, P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neurosci.* 116(3):897-912, 2003.

Wenger, G.R. Effects of phencyclidine and ketamine in pigeons on behavior suppressed by brief electrical shocks. *Pharmacol Biochem Behav.* 12 (6):865-870, 1980.

8. Apêndice

A - Substratos neurais do Sistema de inibição comportamental (SIC) e do Sistema cerebral de defesa (SCD)

O SIC, inicialmente descrito por Gray (1982), tem como substrato neural a formação septo-hipocampal acrescida do circuito de Papez (corpo mamilar do hipotálamo, tálamo anteroventral e córtex do giro do cíngulo), do córtex pré-frontal e das vias noradrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas ascendentes que inervam estas estruturas.

O SCD envolve a amígdala, o hipotálamo medial e a Substância cinzenta periaquedutal (HETEM & GRAEFF, 1997).

A separação dos substratos neurais das reações defensivas em dois sistemas neurais facilita o entendimento e o estudo destas reações. Porém, é importante resaltar que os substratos neurais destes sistemas interagem entre si para a realização das respostas defensivas (para revisão ver MCNAUGHTON & CORR, 2004).

B – Minuto a minuto da %TBA dos animais microinjetados com AP5

3 ou 6 nmol na SCPd e submetidos ao teste e reteste no LCE.

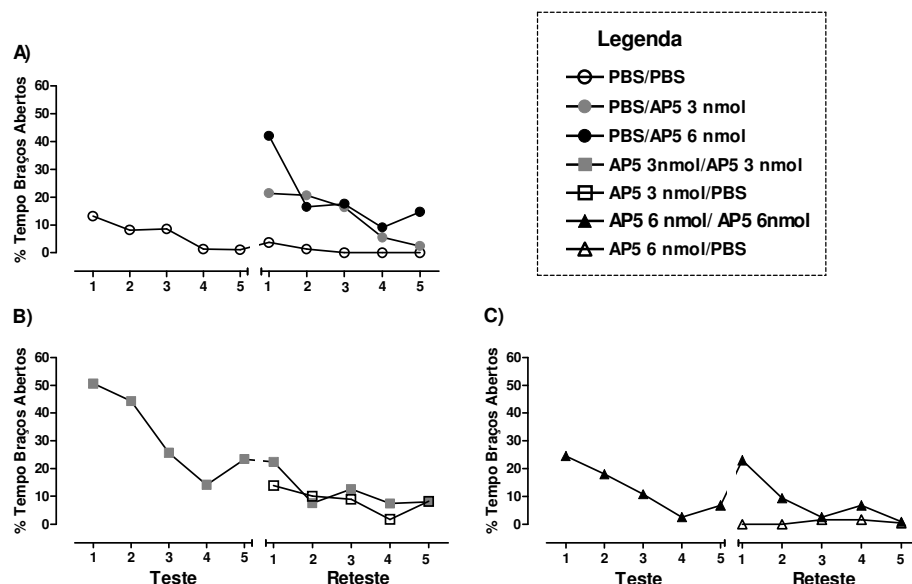


Figura 15. Curva minuto a minuto da % Tempo nos braços abertos de ratos microinjetados com AP5 3 ou 6 nmol na SCPd e submetidos ao teste e reteste no LCE.

C - Minuto a minuto da %TBA dos animais microinjetados com

Ifenprodil 0,5 ou 1 nmol na SCPd e submetidos ao teste e reteste no LCE.

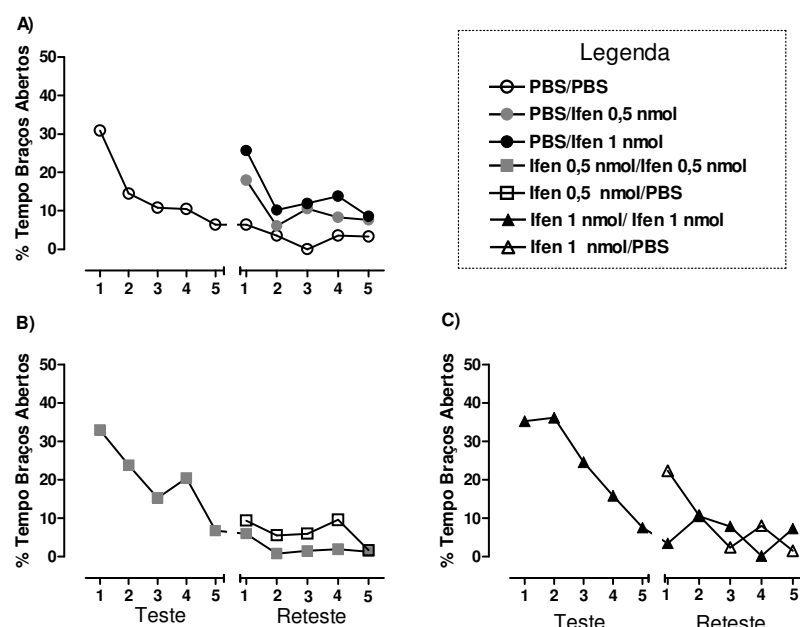


Figura 16. Curva minuto a minuto da % Tempo nos braços abertos de ratos microinjetados com Ifenprodil 0,5 ou 1 nmol na SCPd e submetidos ao teste e reteste no LCE.